

VERHALTEN DER GLYCOSYLIERTEN HÄMOGLOBINE
BEIM HUND UNTER VERSCHIEDENEN
PHYSIOLOGISCHEN, PATHOLOGISCHEN UND
THERAPEUTISCHEN ZUSTANDSBILDERN

Ottemarie Müller

Liss
München
1984

Aus der Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. med. vet. W. Kraft

und dem Institut für Experimentelle Chirurgie der
Medizinischen Fakultät der Technischen Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Blümel

Angefertigt unter der Leitung von
Priv. Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt

VERHALTEN DER GLYCOSYLIERTEN HÄMOGLOBINE BEIM HUND
UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOGISCHEN, PATHOLOGISCHEN
UND THERAPEUTISCHEN ZUSTANDSBILDERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Ottemarie Müller
aus
Fischerhude

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan : Prof. Dr. W. Leidl

Referent : Prof. Dr. W. Kraft

Korreferent : Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion : 27. Juli 1984

INHALTSVERZEICHNIS

I

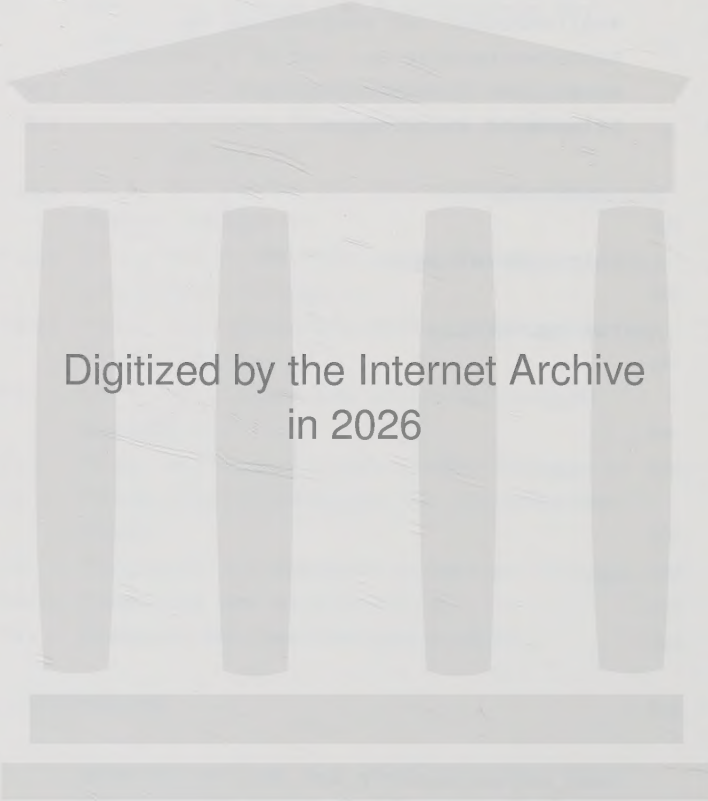
1. EINLEITUNG	1
2. GLYKOSYLIERTE HÄMOGLOBINE	2
2.1. Entdeckung der glycosylierten Hämoglobine	2
2.2. Aufbau der Hämoglobine	3
2.3. Chemische Struktur der glycosylierten Hämoglobine	5
2.4. Glycosylierung des Hämoglobins	6
2.4.1. Bedeutung der Aldiminform	7
2.5. Glycosylierungsreaktionen an anderen Stellen des Hämoglobinmoleküls	8
2.6. Glycosylierung von anderen Hämoglobinen	9
2.7. Glycosylierung von anderen Proteinen	9
2.8. Struktur der schnellwandernden Hämoglobine	10
3. KLINISCHE BEDEUTUNG DES GLYKOHÄMOGLOBINS BEIM MENSCHEN	12
3.1. Glykosyliertes Hämoglobin beim Stoffwechselgesunden	12
3.2. Glykosyliertes Hämoglobin beim Diabetes mellitus	13
3.3. Glykosyliertes Hämoglobin bei anderen Erkrankungen	15
3.4. Hb A ₁ in der Diagnostik des Diabetes mellitus	17
3.5. Langzeitkontrolle des Diabetes mellitus	19

4. GLYKOSYLIERTE HÄMOGLOBINE BEIM TIER	21
4.1. Glykohämoglobin bei der Maus	22
4.2. Glykosylierte Hämoglobine bei der Ratte	23
4.3. Glykosylierte Hämoglobine bei Hamster, Kaninchen und Rhesusaffe	24
4.3.1. Glykohämoglobin beim Hamster	24
4.3.2. Glykosyliertes Hämoglobin beim Kaninchen	25
4.3.3. Glykosyliertes Hämoglobin beim Rhesus- affen	26
4.4. Glykohämoglobin bei der Katze	26
4.5. Glykosylierte Hämoglobine beim Hund	28
5. BESTIMMUNGSMETHODEN	34
5.1. Elektrophorese	34
5.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	35
5.3. Radio Immuno Assay (RIA)	36
5.4. Colorimetrische Methoden	36
5.4.1. Durchführung der colorimetrischen Methoden	38
5.4.2. Spektrometrische Methode (SPM)	39
5.5. Säulenchromatographie	40
5.5.1. Makrosäulentechnik	42
5.5.2. Mikrosäulentechnik	44
5.5.3. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	46
5.5.4. Kommerzielle Kits	46
5.5.5. Störfaktoren bei der Mikrosäule	46
5.6. Methodische Vergleiche der Bestimmungs- methoden	49
5.7. Häufigkeit der verwendeten Methoden	50

6. ZIELSETZUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN	53
7. MATERIAL UND METHODIK	54
7.1. Patientenmaterial	54
7.1.1. Gruppe A - Gesunde Hunde	54
7.1.2. Gruppe B - Hunde mit Fieber und Leukozytose	54
7.1.3. Gruppe C - Hunde mit Umfangsvermehrungen bzw. Tumoren der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems	55
7.1.4. Gruppe D - Hunde mit einer Anämie	55
7.1.5. Gruppe E - Hunde mit Erkrankungen der Leber	56
7.1.6. Gruppe F - Hunde mit Verdacht auf Erkrankung des exokrinen Pankreas	56
7.1.7. Gruppe G - Hunde mit Erkrankungen der Nieren	56
7.1.8. Gruppe H - Hunde mit einer Pseudogravidität	57
7.1.9. Gruppe I - Mit Glucocorticoiden behandelte Hunde	57
7.1.10. Gruppe K - Hunde mit einer Herzerkrankung und einer Herzglykosidbehandlung	57
7.1.11. Gruppe L - Diabetische Hunde	58
7.2. Probenmaterial	59
7.3. Analytische Methoden	60
7.3.1. Enzymatische Bestimmung der Glukose	60
7.3.2. Mikrosäulenchromatographische Bestimmung von Hb A ₁	61
7.4. Statistische Methoden	64
8. ERGEBNISSE	65
8.1. Hb A ₁ bei gesunden Hunden (Gruppe A)	65
8.2. Hb A ₁ bei Hunden mit Fieber und Leukozytose (Gruppe B)	68
8.3. Hb A ₁ bei Hunden mit Umfangsvermehrungen bzw. Tumoren der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems (Gruppe C)	70

8.4.	Hb A ₁ bei Hunden mit einer Anämie (Gruppe D)	73
8.5.	Hb A ₁ bei Hunden mit Erkrankungen der Leber (Gruppe E)	76
8.6.	Hb A ₁ bei Hunden mit Verdacht auf Er- krankung des exokrinen Pankreas (Gruppe F)	78
8.7.	Hb A ₁ bei Hunden mit Erkrankungen der Nieren (Gruppe G)	80
8.8.	Hb A ₁ bei Hunden mit einer Pseudo- gravidität (Gruppe H)	82
8.9.	Hb A ₁ bei glucocorticoidbehandelten Hunden (Gruppe I)	84
8.10.	Hb A ₁ bei Hunden mit Herzerkrankungen (Gruppe K)	86
8.11.	Hb A ₁ bei diabetischen Hunden (Gruppe L)	88
8.11.1.	Verlaufsuntersuchungen bei diabetischen Hunden	94
8.12.	Vergleich der Meßwerte einzelner Gruppen	102
8.12.1.	Vergleich der Altersgruppen	107
8.13.	Ergebnis der Qualitätskontrollen	110
9.	DISKUSSION	112
9.1.	Quantifizierung der glykosylierten Hämoglobine bei gesunden, kranken und diabetischen Hunden	113
9.1.1.	Glykosylierte Hämoglobine in verschiedenen Altersstufen	114

9.1.2.	Quantifizierung der glykosylierten Hämoglobine bei kranken, nichtdiabetischen Hunden	115
9.1.3.	Quantifizierung der Hb A ₁ -Werte bei diabetischen Hunden	122
9.2.	Möglichkeiten der Überwachung der Diabetestherapie mit der Hb A ₁ -Bestimmung unter Praxisbedingungen	122
9.4.	Allgemeine Folgerungen	125
10.	ZUSAMMENFASSUNG	128
11.	LITERATURVERZEICHNIS	130
12.	ABKÜRZUNGSTABELLE	163



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0046

1. EINLEITUNG

Spontaner Diabetes mellitus kommt unter den Haustieren besonders häufig beim Hund vor. Die therapeutische Beherrschung des Diabetes mellitus beim Tier bereitet trotz großer Fortschritte auf biochemischem, physiologischem und pathologischem Gebiet immer noch Schwierigkeiten.

Die bisherigen Kontrolluntersuchungen zur Therapieüberwachung und die sich daran anlehrenden Behandlungsmaßnahmen versuchen, das Ausmaß der Stoffwechselstörungen zu begrenzen.

Die Kontrollmöglichkeiten des Diabetes mellitus beschränkten sich bisher auf die Messung sich schnell ändernder Parameter wie Normo- oder Polydipsie, der Blutzuckerspiegel und die Glukoseausscheidung im Urin. Sie werden leicht durch Nahrungsaufnahme, körperliche Aktivität und Streß beeinflusst. Mit der Entdeckung, daß Glukose langfristig an Proteine, z.B. Serum-Albumine und Hämoglobin, gebunden wird, haben sich neue Möglichkeiten der langfristigen Diabetesüberwachung und Therapiekontrolle beim Menschen ergeben.

Die Bestimmung der glykosylierten Hämoglobine, die inzwischen in der Humanmedizin zum Teil schon zur Routineuntersuchung geworden ist, ermöglicht die summarische Beurteilung der Glukosestoffwechsellage. Sie gestattet eine retrospektive Aussage über die Qualität der Stoffwechselsituation.

Beim Hund ist ein vergleichbares Verhalten der glykosylierten Hämoglobine beim Diabetes mellitus beobachtet worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, inwieweit auch andere - nichtdiabetisch physiologische, pathologische und therapeutische - Einflüsse zu einer Änderung des prozentualen Anteils der glykosylierten Hämoglobine am Gesamthämoglobin beitragen.

2. CHARAKTERISIERUNG DER GLYKOSYLIERTEN HÄMOGLOBINE

2.1. Entdeckung der glykosylierten Hämoglobine

Im Jahre 1955 wurde von KUNKEL und WALLENIUS (121) mit Hilfe der Stärkeblockelektrophorese die Heterogenität des menschlichen Hämoglobins nachgewiesen. Im gleichen Jahr trennten MORRISON und COOK (147) nicht denaturiertes Hämoglobin erstmals mittels Chromatographie auf. ALLEN et al. (4) fanden 1958 bei der Untersuchung von Hämolysat aus Humanblut durch Chromatographie an Kationenaustauscher-Säulen, daß vor der Hauptmenge des Hämoglobins fünf kleinere, negativ geladene Fraktionen eluiert werden konnten, die in der Reihenfolge ihrer Elution als Hb A₁a, Hb A₁b, Hb A₁c, Hb A₁d und Hb A₁e bezeichnet wurden. Die letzten beiden Fraktionen waren nicht regelmäßig nachzuweisen. Sie traten in frischen Blutproben nie auf, so daß sie als in vitro-entstandene Reaktionsprodukte von Hämoglobin mit anderen Molekülen angesehen werden (106).

Die Heterogenität des menschlichen Hämoglobins wurde in der Folgezeit von mehreren Autoren (44,162,179) auch mittels anderer Methoden (105) bestätigt. Die Forschung konzentrierte sich auf Hb A₁c, welches mit einem Anteil von 3 - 6 % am Gesamthämoglobin den weitaus größten Teil der schnellwandernden Hämoglobine ausmacht.

Im Jahre 1962 konnten HUISMAN und DOZY (105) erstmals eine Beziehung zwischen Hb A₁c und Diabetes mellitus herstellen. Sie stellten bei vier mit dem oralen Antidiabetikum Tolbutamid behandelten Diabetikern eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Hb A₁c-Konzentration fest. Durch eine Inkubation der Erythrozyten mit Tolbutamid in vitro war die Erhöhung der

Hb A₁c-Werte nicht zu erreichen. Daher war diese Beobachtung direkt mit dem erhöhten Blutzuckerspiegel in Zusammenhang zu bringen.

RHABAR (163) wies 1968 nach, daß bei Diabetikern regelmäßig eine "abnormale" Hämoglobinfraction vorhanden ist. Sie ist chromatographisch und elektrophoretisch mit der von ALLEN et al. (4) beschriebenen Hb A₁c-Fraktion (164) identisch.

Die Annahme von PAULSEN (156), Hb A₁c sei ein spezifisch genetischer Marker für Diabetes mellitus, wurde durch Zwillingsforschung und Tierversuche widerlegt.

HOLMQUIST und SCHRÖDER (104) zeigten 1966, daß Hb A₁c mit dem beim Menschen weit überwiegenden Hb A, bestehend aus den Aminosäureketten $\alpha_2\beta_3$, bis auf einen unbekannten Rest am N-terminalen Ende der β -Ketten, also am endständigen Valin, identisch ist. Dieser Rest wurde 1968 von BOOKCHIN und GALLOP (18) als Hexose, 1975 von BUNN et al. (31) als Glukose identifiziert. Das führte zu der Bezeichnung "glykosyliertes Hämoglobin" oder "Glykohämoglobin" für Hb A₁c.

2.2. Aufbau der Hämoglobine

Hämoglobin ist ein Chromoproteid, in dem vier Polypeptidketten mit je einer Farbstoffgruppe (Häm) zu einem Molekül aggregat zusammengeschlossen sind. Die vier gleichartigen Farbstoffkomponenten eines Hämoglobinmoleküls können als Protoporphyrine mit zentralen zweiwertigen Eisenatomen gekennzeichnet werden.

Der Globinanteil besteht aus vier Polypeptidketten, von denen zwei identisch sind. Die in ihrer Aminosäuresequenz unterschiedlichen Polypeptidketten des Globins werden als α -, β -, γ - und δ -Ketten bezeichnet. Hämoglobin A besteht aus zwei α -Ketten mit je 141 Aminosäuren und zwei β -Ketten mit je 146 Aminosäuren. Es bildet mit einem Anteil von ca. 92 % den Hauptanteil des Erwachsenenhämoglobins.

Hb A₂ verhält sich funktionell wie Hb A. Anstelle der β -Ketten befinden sich δ -Ketten, die sich in zehn Aminosäuren von den β -Ketten unterscheiden, im Globin.

Hämoglobin F (2 α -, 2 γ -Ketten) ist vor allem beim Fetus und in den ersten Lebensmonaten nachweisbar, beim Erwachsenen beträgt sein Anteil am Gesamthämoglobin noch etwa 0,5 % (211).

5 - 7 % des Gesamthämoglobins bilden Hämoglobinunterarten, die nur geringe Abweichungen vom Hb A zeigen. Dazu gehören Hb A_{1a}, Hb A_{1b} und Hb A_{1c}, die alle einen geringeren isoelektrischen Wert als Hb A aufweisen und elektrophoretisch schneller wandern. Der Hb A_{1c}-Anteil ist mit 4 - 6 % der bedeutendste Anteil (217).

Die Bildung von Hb A₁ erfolgt erst im zirkulierenden Erythrozyten und ist abhängig von der Stoffwechsellaage, insbesondere von der Blutglukose-Konzentration. Im Gegensatz dazu sind die Synthesen der Hämofraktionen A, A₂ und F genetisch unterschiedlich kodiert.

2.3. Chemische Struktur der glykosylierten Hämoglobine

Abweichend von der Hämoglobinsynthese an den Ribosomen der Erythrozytenvorstufen im Knochenmark findet die Bildung von Hb A_{1c} erst nach der Einschwemmung aus dem Knochenmark am zirkulierenden Erythrozyten statt.

In den Erythroblasten des Knochenmarks sind nach Untersuchungen von BUNN et al. (34, 35) keine Glykosylierungsvorgänge nachweisbar.

Die Glykosylierungsreaktion verläuft langsam und führt, wie später ausführlich beschrieben, über eine labile, reversible zu einer stabilen, irreversiblen Bindung. Sie wird nicht enzymatisch katalysiert und ist nicht genetisch, sondern metabolisch bedingt.

Der Hb A₁-Gehalt der Erythrozyten steigt mit zunehmendem Zellalter bis zu einem Maximum nach ungefähr 100 Tagen nahezu linear an (33,118). Danach beginnt der Abbau bzw. das natürliche Absterben der Erythrozyten. Die Halbwertszeit von Hb A_{1c} wird von MARQUARDT (136) für den Menschen mit 59 Tagen angegeben.

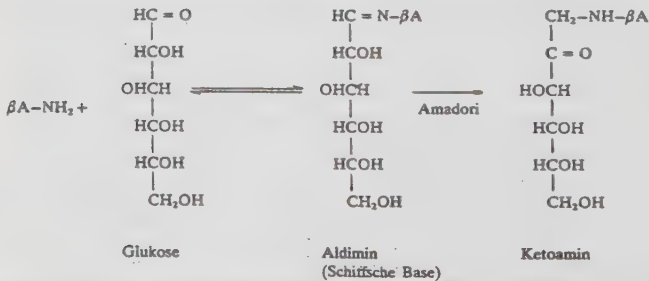
Die Glykosylierungsreaktion kann in vitro sowohl an intakten Erythrozyten als auch am Hämolysat durch Glukoseinkubation nachvollzogen werden (32,117,152). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die Neubildungsrate des glykosylierten Hämoglobins proportional der Inkubationszeit und der Glukosekonzentration des Mediums ist. Die Menge an Hb A_{1c} entspricht demnach dem Produkt aus Zeit und der jeweiligen Glukosekonzentration, die in vivo der Glukosekonzentration des peripheren Blutes gleichzusetzen ist. Im Intrazellu-

Im Raum der roten Blutkörperchen herrscht die gleiche stationäre Glukosekonzentration wie im Plasma, da die Erythrozytenmembran des Menschen für Glukose frei durchlässig und die Penetration unabhängig vom Insulinspiegel ist (172).

Auf Grund der erhöhten Blutzuckerkonzentrationen beim Diabetiker wird bei ihm auch eine erhöhte Menge von Hb A_{1c} gebildet. Die Synthese verläuft wegen vermehrt vorhandener Glukose etwa 2,7 mal schneller als bei physiologischen Blutzuckerkonzentrationen (117). Beim stoffwechselgesunden Erwachsenen liegt der Anteil des Hb A₁ bei $6,5 \pm 1,5 \%$ (156, 206), während er bei diabetischen Erwachsenen auf $13,4 \pm 2,3 \%$ (157) des Gesamthämoglobins ansteigen kann.

2.4. Glykosylierung des Hämoglobins

Die Reaktion der Glykosylierung umfaßt folgende Schritte :



Zweistufige Reaktion der Bildung von Glykohämoglobin. Instabiles Aldimin wird durch Amadori-Umlagerung in relativ stabiles Ketoamin verwandelt

Abb. 1

FLÜCKIGER und WINTERHALTER (75)

Die Glukose reagiert mit der Aminogruppe des endständigen Valins unter Bildung einer Schiff'schen Base, der sogenannten Aldiminform. In einem zweiten Schritt wird

sie dann durch eine "Amadori"-Umlagerung in das stabile Ketoamin umgeformt. Beweis hierfür ist die Tatsache, daß am C_2 -Atom keine reduzierende OH-Gruppe mehr vorhanden ist (74).

Während die Bildung der Schiff'schen Base relativ rasch und größtenteils reversibel erfolgt, handelt es sich bei der Amadori-Reaktion um einen eher kontinuierlichen, irreversiblen Vorgang. Das instabile Aldimin wird auch als labile Form des Hb A_1 bezeichnet. Die Labilität drückt sich dadurch aus, daß eine 60mal höhere Neigung zur Dissoziation in Hb A und freie Glukose als zur Amadori-Umlagerung in die stabile Ketoaminform besteht (33).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Ketoaminform stabil. Sie wird allein bei der natürlichen Alterung der Erythrozyten mit abgebaut. Daher ist die Menge der glykosylierten Hämoglobine bei herabgesetzter Erythrozytenlebensdauer (z. B. hämolytische Anämie) vermindert. Dies konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden (34).

2.4.1. Bedeutung der Aldiminform

Die Aldiminform des Hb A_{1c} ist für kurzfristige Schwankungen des Hb A_1 -Wertes verantwortlich. SVENDSEN et al. (195) konnten einen Anstieg des Hb A_1 bei Diabetikern 12 Stunden nach Absetzen der Medikation feststellen. Sie wiesen einen entsprechenden Abfall nach Wiederherstellung einer ausgewogenen Stoffwechsellage nach.

DANEMAN (46), LESLIE (128) und TROVATI (206) beobachteten ebenfalls eine signifikante Senkung des Glykohämoglobinspiegels nach Einleitung einer Diabetestherapie innerhalb von 24 - 48 Stunden.

Auch bei Stoffwechselgesunden konnte nach Durchführung eines oralen Glukose-Toleranztests (oGTT) ein Anstieg des Hb A₁-Wertes festgestellt werden (212). So stieg der Hb A₁-Wert bei Diabetikern drei Stunden nach einem oGTT um 0,7 % von 11,3 % auf 12,0 % an. Nach 24 Stunden hatte der Hb A₁-Wert die Ausgangslage wieder erreicht (173).

HENRICHS (100) faßte den Sachverhalt folgendermaßen zusammen : Die Aldiminform beschreibt den aktuellen Zustand der letzten 6 - 12 Blutzuckerstunden, während die Ketoaminform als Monitor der letzten 100 - 120 Blutzuckertage verstanden wird.

2.5. Glykosylierungsreaktionen an anderen Stellen des Hämoglobinmoleküls

Untersuchungen von BUNN et al. (36) zeigen, daß Glukose außer mit dem aminoterminalen Ende der β -Ket-ten auch mit anderen Aminogruppen des Hämoglobin-moleküls reagieren kann.

Dabei können Glykosylierungen an den N-terminalen Enden der α -Ket-ten und den ϵ -Aminogruppen der Lysin-reste von α - und β -Ket-ten stattfinden; die nachgewie-sen, jedoch mit den herkömmlichen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren nicht gesondert ab-getrennt werden können (37).

Das Ausmaß dieser Reaktionen ist jedoch relativ gering, da diese Aminosäurenreste einen relativ hohen (ca. 10) pK-Wert haben. Die Glykosylierung findet zu etwa 90 % an der NH₂-Gruppe des β -Valin-1 statt, da es einen wesentlich geringeren pK-Wert von 6,8 und dadurch eine wesentlich höhere Reaktionsbereitschaft hat (76, 82).

Das endständige Valin der β -Ketten ist jedoch gleichzeitig der Ort, wo 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) gebunden wird, was eine zusätzliche Anheftung von Glukose an dieser Stelle erschwert. Die Tatsache der bevorzugten Glykosylierung am N-terminalen Ende der β -Ketten kann zur Zeit noch nicht ausreichend erklärt werden.

2.6. Glykosylierung von anderen Hämoglobinen

Glykosylierungsreaktionen laufen auch an anderen Proteinen ab, da sie nicht enzymatisch gebunden sind. Der Reaktionsablauf und seine Geschwindigkeit sind von der jeweiligen Dissoziationskonstanten (pK-Wert) abhängig (34, 75). Daraus folgt, daß auch andere Hämoglobinarten glykosyliert werden können. Eine Glykosylierung wurde bei Hb S und Hb C nachgewiesen (2, 188). Bei Hb D, Hb F, Hb H und Hb J gilt sie als wahrscheinlich (181).

In der Reaktionsrate Glukose/Hämoglobin scheint kein Unterschied zwischen den verschiedenen Hämoglobinvarianten vorhanden zu sein (2, 73).

2.7. Glykosylierung von anderen Proteinen

Vor allem Proteine des Blutplasmas sind beim Diabetes mellitus erhöhten Glukosekonzentrationen ausgesetzt. Sie binden bevorzugt an ϵ -Lysinreste Glukose (99). Ihre Halbwertszeit ist jedoch im Verhältnis zum glykosylierten Hämoglobin herabgesetzt. Weiterhin unterscheiden sie sich dadurch, daß am Hämoglobin viermal mehr Glukosemoleküle gebunden wird als am Serumprotein (59, 99, 114, 115).

Das Ausmaß der Glykosylierung kann sowohl am Gesamteiweiß (140, 221) als auch am Albumin (58, 99) durch

Cholorimetrie bestimmt werden.

Auch beim Fibrinogen, Makroglobin und Haptoglobin wurde eine vermehrte Glykosylierung nachgewiesen (110). Sie wird vor allem in Geweben gefunden, in denen die Penetration von Glukose insulinabhängig ist (63). Besonders wichtig ist diese Tatsache bei Eiweißmolekülen mit langer Lebensdauer, da sie beim Diabetes mellitus längere Zeit einer hohen Glukosekonzentration ausgesetzt sind. Eine vermehrte postsynthetische Glykosylierung von Basalmembranen wird als sicher angesehen. Sie wurde bei glomerulären Basalmembranen und Membranproteinen der Blutgefäße nachgewiesen. Zu einer vermehrten Glykosylierung kommt es auch an den Proteinen der Linse, der Retina, dem Kollagen der Haut und dem Myelinprotein der Nervenscheiden (35,191). Hierin liegt vermutlich ein Teil der diabetischen Spätschäden begründet, da es durch die Glykosylierung zu Membran- und damit zu Funktionsänderungen kommt (35,205).

Die Glykosylierung des Hämoglobins gibt nicht nur einen Hinweis auf das Ausmaß der Glykosylierung anderer Proteine, sondern gilt auch als Modell für die wahrscheinliche Pathogenese der Spätschäden beim Diabetes mellitus (91,205).

2.8. Struktur der anderen schnellwandernden Hämoglobine

Die schnellwandernden Hämoglobine werden zusammenfassend als Hb A₁ bezeichnet.

In der Reihenfolge ihrer Elution unterscheidet man Hb A_{1a}, Hb A_{1b} und Hb A_{1c}.

MC DONALD et al. (138) fanden 1978 bei der Untersuchung menschlichen Hämolysats mit einer modifizierten säulenchromatographischen Technik, daß Hb A_{1a} aus zwei

verschiedenen Fraktionen besteht, die in der Reihenfolge ihrer Elution als Hb A₁a₁ und Hb A₁a₂ bezeichnet werden. Mit Hilfe der Thiobarbitursäuremethode (vgl. 5.4.) wiesen sie nach, daß alle drei Fraktionen von Hb A₁a₁, Hb A₁a₂ und Hb A₁b glykosylierte Modifikationen von Hb A sind. Sie unterscheiden sich dadurch, daß beim Hb A₁a₁ zwei, beim Hb A₁a₂ eine und beim Hb A₁b keine Phosphatgruppe am Hexoserest vorhanden ist. Hb A₁a₁ wurde als Fructose-1,6-Biphosphat-Hämoglobin, Hb A₁a₂ als Glukose-6-Phosphat-Hämoglobin identifiziert (89).

Die Struktur von Hb A₁b ist zur Zeit noch ungenügend geklärt. Es wird vermutet, daß es sich bei Hb A₁b um eine Modifikation von Hb A₁c handelt, bei der die β -Kette verändert wurde (120,125).

3. KLINISCHE BEDEUTUNG DES GLYKOHÄMGOLOBINS BEIM MENSCHEN

3.1. Glykosyliertes Hämoglobin bei Stoffwechsel- gesunden

Die glykosylierten Hämoglobine wurden erstmals bei Stoffwechselgesunden entdeckt (4). Der Anteil des Glykohämoglobins ist dabei in engen Grenzen konstant. Variationen sind sowohl durch individuelle Schwankungen als auch durch unterschiedliche Normalwerte bei den einzelnen Bestimmungsmethoden bedingt (80). Die Hb A₁-Werte eines Probanden bleiben über Monate konstant (6,28). Eine Abhängigkeit von Geschlecht und Körpergewicht besteht nicht (62,207).

DAVIS et al. (50) stellten eine Abhängigkeit vom Lebensalter fest (vgl. Tab. 2). BOUCHER et al. bestätigten eine Hb A₁-Erhöhung mit zunehmendem Alter der Probanden, die unabhängig vom aktuellen Blutzuckerspiegel war. Vergleichbare Werte sind nicht angegeben (19).

Untersuchungen an eineiigen Zwillingen, die sich bezüglich der Diabetes mellitus-Erkrankungen voneinander unterscheiden, zeigen bei den nicht-diabetischen Zwillingen Hb A_{1c}-Werte im Normbereich (202). Daraus folgt, daß der Glykohämoglobinspiegel nur von der metabolischen Stoffwechselsituation abhängig ist und nicht genetisch bedingt ist (152,195). Dies wird von Untersuchungen an Kindern diabetischer Elternteile unterstützt. Auch hier weisen Stoffwechselgesunde Hb A₁-Werte im Normalbereich auf (156).

Tab. 1 Untersuchungsergebnisse gesunder und
diabetischer Kinder und Zwillinge (157)

Probanden	% Hb A ₁
Gesunde Kinder	6,9 + 1,2
Gesunde Zwillinge	7,2 + 0,5
Diabetische Kinder	12,8 + 0,3
Diabetische Zwillinge	12,6 + 2,3

3.2. Glykosyliertes Hämoglobin beim Diabetes mellitus

Bei Diabetikern entstehen durch erhöhte Blutglukosekonzentrationen vermehrt glykosylierte Hämoglobine.

Es kann jedoch kein exakter Grenzwert angegeben werden, der die Hb A₁-Werte in einen Normbereich und in einen diabetischen Bereich trennt (217). Ebenso wie bei dem Blutzuckerwert gibt es fließende Übergänge zwischen "stoffwechselgesund" und "diabetisch".

Da die Normwerte nur durch Untersuchungen bei Stoffwechselgesunden festgelegt werden können, muß der "Stoffwechselgesunde" definiert werden. Ein Diabetes mellitus kann ausgeschlossen werden, wenn der Nüchternblutzucker zwischen 70 und 100 mg/100 ml liegt und bestimmte Blutzuckergrenzwerte beim oralen Glukose-Toleranz-Test (oGTT) nicht überschritten werden. Die Blutzuckergrenzwerte können mit erheblichen Schwankungsbreiten festgelegt sein (56), so daß dadurch eine unterschiedliche Einteilung in "diabetisch" und "nicht-diabetisch" erfolgt. Die Durchschnittswerte sind jedoch für Diabetiker immer deutlich höher als für Nichtdiabetiker.

Tab. 2 Hämoglobin A1-Werte nach verschiedenen Literaturangaben

Hämoglobin A1 (gesamt)

Patientengut	Anzahl	Mittelwerte	Literaturstelle
Gesunde Erwachsene	20	$6,5 \pm 1,5 \%$	
Jugendl. Diabetiker	25	$12,4 \pm 3,1 \%$	
Erwachsene Diabetiker	75	$11,0 \pm 2,9 \%$	(205)
Gesunde Zwillinge	16	$6,9 \pm 0,3 \%$	
Zwillinge mit Diabetes	16	$10,0 \pm 0,7 \%$	(202)
Gesunde Kinder	65	$6,9 \pm 1,2 \%$	
Gesunde Erwachsene	20	$6,5 \pm 1,5 \%$	(156)
Gesunde Personen	42	$8,2 \pm 1,2 \%$	
Altersdiabetiker	29	$12,7 \pm 3,4 \%$	(97)
Gesunde Personen 4 - 20 Jahre	8	$5,9 \pm 1,3 \%$	
Gesunde Personen 21 - 45 Jahre	26	$5,6 \pm 0,7 \%$	
Gesunde Personen über 45 Jahre	12	$7,1 \pm 0,9 \%$	
Jugenddiabetiker	56	$12,1 \pm 2,4 \%$	(50)

Hämoglobin A1 (differenziert)

Patientengut	Anzahl	Mittelwerte		Literaturstelle
		Hb A1c	Hb A1a+b	
Gesunde Personen	52	4,5 %	2,0 %	
Latente Diabetiker	17	5,1 %	2,1 %	
Manifeste Diabetiker	73	8,5 %	2,8 %	(57)

3.3. Glykosylierte Hämoglobine bei anderen Erkrankungen

Eine Erhöhung des Hb A₁-Spiegels wurde zunächst als beweisend für das Vorliegen eines Diabetes mellitus angesehen (164).

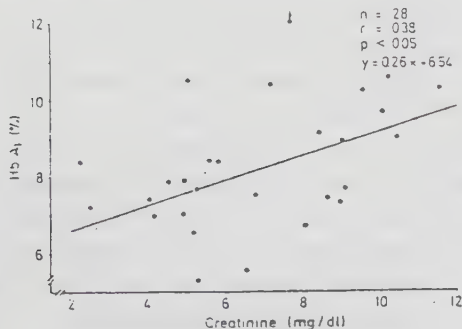
Es gibt jedoch auch Stoffwechselsituationen, die eine Erhöhung der glykosylierten Hämoglobine bewirken, ohne daß eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels vorliegt.

Erhöhte Hb A₁-Werte wurden bei der Untersuchung von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bzw. dialysepflichtigen Patienten beobachtet (15,40,175, 192). Bei den untersuchten Patienten waren jedoch normale Nüchternblutzuckerwerte und eine normale Glukosetoleranz vorhanden.

Auch bei der Verwendung glukosefreier Dialyseflüssigkeit blieben die erhöhten Hb A₁-Werte bestehen (175). Bei chronischer Niereninsuffizienz geht die Korrelation zwischen Nüchternblutzucker bzw. Glukose-Toleranz-Test und dem Hb A₁-Spiegel verloren (15,98,192).

Der Hb A₁-Wert korreliert nur mit dem Kreatinin-Spiegel, also dem Grad der Niereninsuffizienz (11,175,192).

Abb. 2



Correlation between HbA₁ and plasma creatinine

Eine Erklärung für den erhöhten Glykohämoglobinspiegel wurde noch nicht gefunden, da auf Grund der verkürzten Erythrozytenlebensdauer bei Niereninsuffizienz eher ein erniedrigter Hb A₁-Wert zu erwarten ist (15).

Es wird vermutet, daß beim Vorliegen einer Niereninsuffizienz Phasen unerkannter Hyperglykämie auftreten (175).

Der Anstieg der Hb A₁-Werte ist möglicherweise auch auf den erhöhten Fructose-1,6-Diphosphatgehalt der Erythrozyten bei urämischen Patienten zurückzuführen (126).

Im Gegensatz zum Diabetiker wurde beobachtet, daß bei urämischen Patienten der Hb A_{1a+b}-Anteil deutlich vermehrt war, während der Diabetiker hauptsächlich erhöhte Hb A_{1c}-Werte aufweist (156).

Bei Kindern mit Mukoviscidose wurden verschiedentlich erhöhte Hb A₁-Werte festgestellt (150,156,157,188), wobei anfangs vorübergehende hyperglykämische Phasen (188) und ein sich regelmäßig einstellender Insulinmangel (150) als Ursache angesehen werden.

Erhöhte Hb A₁-Werte werden auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen (Leukämie) gefunden (57).

Nach Splenektomie erhöhte Hb A₁-Werte lassen sich aus dem verzögerten Abbau alter Erythrozyten, die am meisten Glykohämoglobin enthalten, erklären (68).

Auch bei einer Eisenmangelanämie kommt es zu erhöhten Hb A₁-Werten durch das Überwiegen älterer Erythrozyten, da die Erythropoese herabgesetzt ist. Nach entsprechender Therapie des Eisenmangels fällt der Hb A₁-Spiegel in den Normalbereich zurück (8,29,186).

Vorübergehende Blutzuckererhöhungen, die nicht durch einen Diabetes mellitus verursacht sind, führen zu einer Erhöhung des Glykohämoglobinspiegels. Dies kann nach längerer Infusion hochprozentiger Glukoselösungen (159) und bei Behandlung mit Corticosteroiden ausgelöst werden (157).

Bei Verwendung der Säulentekniken können hohe Hb F-Konzentrationen bei Neugeborenen und Hämoglobino-pathien (Hb J und Hb H) einen hohen Hb A₁-Wert vortäuschen (32,124). Bei der Sichelzellanämie (Hb S) und dem Vorliegen von Hb C und Hb D können falsch-niedrige Hb A₁-Werte gemessen werden (124).

Eine Erhöhung der Hb A₁-Werte wurde festgestellt, wenn die Erythrozytenlebensdauer herabgesetzt ist. Dies ist bei hämolytischen Anämien (32), häufigem Aderlaß (171) und bei Medikamentengaben wie Dapson, Sulphazalazin und Phenacetin (116) der Fall, die zu einem erhöhten Erythrozytenabbau oder -zerfall führen. Ebenso kann eine verstärkte Erythropoese, durch eine Infektion (11) oder medikamentell durch Eisengabe (28) ausgelöst, den Hb A₁-Spiegel senken.

3.4. Hämoglobin A₁ in der Diagnostik des Diabetes mellitus

Nach der Entdeckung, daß der Glykohämoglobinspiegel von der Höhe des Blutglukosespiegels und der Dauer einer Hyperglykämie abhängig ist, wurden zahlreiche Untersuchungen darüber durchgeführt, ob mit Hilfe der Hb A₁-Bestimmung allein oder mit anderen Untersuchungsmethoden kombiniert, eine sichere Diagnose bzw. Bestimmung des Schweregrades des vorliegenden Diabetes mellitus möglich ist.

Eine schwache Korrelation zwischen Hb A₁-Wert und Nüchternblutzucker ist auch bei Stoffwechselgesunden vorhanden. Sie wird bei der Untersuchung von Diabetikern jedoch ausgeprägter, ebenso der Zusammenhang zwischen Hb A₁ und oralem Glukose-Toleranz-Test (oGTT) (131).

Die Hb A_{1c}-Bestimmung wird als geeignete Diabetes-Screening-Methode angesehen, weil der Hb A_{1c}-Wert mit der maximalen Glukoseantwort auf einen oGTT korreliert (41,118).

Dem stehen Untersuchungsergebnisse anderer Autoren gegenüber. Sie stellten fest, daß Probanden mit verminderter Glukosetoleranz durchschnittlich höhere Hb A₁-Spiegel als Stoffwechselgesunde haben. Diese Unterschiede sind aber nicht ausreichend signifikant, um eine sichere Aussage zu treffen (17,55).

Die Aussagekraft der Glykohämoglobinmessung wird verbessert, wenn selektiv Hb A_{1c} bestimmt wird (139).

Der Hb A_{1a+b}-Spiegel ist erst bei manifestem Diabetes erhöht, während sich der Hb A_{1c}-Wert schon bei subklinischem Diabetes mellitus erhöht.

Der oGTT erwies sich als empfindlicherer Parameter des Glukosestoffwechsels als das Glykohämoglobin (17): von Patienten mit gestörter Glukosetoleranz haben 21 % normale Hb A₁-Werte.

Um eine Erhöhung der glykosylierten Hämoglobine herbeizuführen, muß der Stoffwechsel stärker gestört sein, als lediglich eine verminderte Glukosetoleranz im oGTT (111). Eine herabgesetzte Glukosetoleranz kann fälschlicherweise zu der Diagnose "Diabetes mellitus" führen, da der oGTT eine unphysiologische Stoffwechselbelastung darstellt (55,56). Ein Proband mit verminderter Glukosetoleranz im oGTT hat möglicherweise bei normaler Stoffwechselbelastung normale Blut-

zuckerwerte, was durch einen normalen Glykohämoglobinspiegel nachweisbar ist.

Ein normaler Hb A₁ Wert schließt einen leichten Diabetes zwar nicht aus (123), läßt jedoch den Schluß zu, daß keine erhebliche Hyperglykämie besteht. In diesem Fall sind therapeutische Maßnahmen nicht erforderlich.

Die Bestimmung der glykosylierten Hämoglobine ist zur sicheren Diabetes-Diagnostik eine hilfreiche Ergänzung. Sie hat zudem gegenüber der Durchführung eines oGTT wesentliche praktische Vorzüge. Sie ist für den Patienten mit geringerem Zeitaufwand verbunden und erfordert keinerlei Vorbereitung; während beim oGTT eine mindestens zweistündige Anwesenheit mit zwei- bis dreimaliger Blutentnahme erforderlich ist. Das Ergebnis des oGTT kann durch vorherige körperliche Belastung, Infektionen, vorausgegangene Diät und dem Zeitpunkt der Testdurchführung beträchtlich schwanken und ist außerdem nicht reproduzierbar (56).

3.5. Langzeitkontrolle des Diabetes mellitus

Die Messung der glykosylierten Hämoglobine macht eine Langzeitkontrolle der Diabetiker möglich. Bisher war die Stoffwechsellage nur an Hand von Parametern zu überwachen, die kurzfristigen Schwankungen unterliegen (145,151). Da die stabile Form des Hb A₁ in den Erythrozyten gespeichert wird, bleibt es dort während der Erythrozytenlebensdauer von 100 - 120 Tagen nachweisbar. Bei kontinuierlichem Zellauf- und -abbau der Erythrozyten gibt der Hb A₁-Spiegel einen Überblick über die Höhe des Blutzuckerspiegels der letzten zwei bis drei Monate (3,10,53,57,82,87,96,123,128,161,176).

Zwischen der Qualität der Stoffwechseleinstellung über einen längeren Zeitraum und dem Hb A₁-Wert besteht eine positive Korrelation. Die Stoffwechseleinstellung wurde dabei mit den Parametern Nüchternblutzucker, mittlerer Tagesblutzuckerspiegel oder 24-Stunden-Urinzucker-Ausscheidung überwacht. Diese Befunde führten zu der Auffassung, daß der Hb A₁-Wert Rückschlüsse auf den mittleren Tagesblutzuckerspiegel der vorangegangenen vier bis sechs Wochen erlaubt (88,92,100,196).

Bei instabilem Diabetes mit starken Blutzuckerschwankungen kann der Anteil an labilem Hb A₁ bis zu 20 % vom Gesamt-Hb A₁ betragen und damit nur Aussagen über kürzere Zeitabschnitte erlauben. Unter klinischen Gesichtspunkten spielt der labile Hb A₁-Anteil keine wesentliche Rolle, da er nur bei derart hohen Glykohämoglobinspiegeln beobachtet wurde, die eine Verbesserung der Stoffwechseleinstellung erforderte (88).

Ein Vorteil der Hb A₁-Bestimmung liegt in der Möglichkeit, den Langzeiteffekt einer Therapieänderung zu objektivieren. Besonders wertvoll könnte die Einführung dieser Meßgröße dadurch werden, daß die Bedeutung der guten Stoffwechseleinstellung, durch Hb A₁-Serienbestimmungen erfaßt, für die Prävention der diabetischen Spätschäden endgültig bewiesen werden könnte (65,216).

4. GLYKOSYLIERTE HÄMOGLOBINE BEIM TIER

Glykosylierte Hämoglobine wurden bisher bei Maus (74,107,117), Ratte (51,170,178,208), Hamster (132), Kaninchen (39,70,103,205), Rhesusaffen (215), Pferd (74), Katze (70,74) und Hund (70,107,112,218) nachgewiesen.

Beim Schaf konnten keine glykosylierten Hämoglobine gemessen werden. Am Schafhämoglobin findet keine Glykosylierung der N-terminalen Aminogruppen an den β -Ketten statt. Dieses vom Humanhämoglobin abweichende Verhalten wurde ausgenutzt, um einen Radio-Immuno-Assay zur Bestimmung von glykosyliertem Hämoglobin zu entwickeln (107).

Auch gegen Glykohämoglobin des Hundes und der Maus werden Antikörper gebildet. Der Schafantikörper erkennt die Ketogruppe des Hb A_{1c} als Antigen.

ERHARDT et al. (70) fanden beim Schaf schnellwandernde Hämoglobine. Mit der Mikrosäulentechnik wurde ihr Anteil mit $10,5 \pm 1,64$ % gemessen. Legt man die Ergebnisse von JAVID (107) zugrunde, kann dieser Anteil des Hämoglobins nicht mit den Glykohämoglobinen identisch sein.

Das Schafhämoglobin besitzt jedoch nach Untersuchungen von BUNN (30) ein oder zwei Hauptkomponenten, die mit 2,3-DPG reagieren. Die Reaktionsfähigkeit ist je nach Rasse unterschiedlich und beruht auf strukturellen Unterschieden der β -Kette.

Eine Interpretation der von ERHARDT et al. (70) gemessenen schnellwandernden Hämoglobine beim Schaf ist ohne Berücksichtigung des Hämoglobintyps sehr schwierig.

ERHARDT et al. (70) fanden bei jugendlichen Schweinen durch Messungen mittels Mikrosäulenchromatographie einen mittleren Hb A₁-Wert von $3,7 \pm 1,68$ %. Dieser Wert läßt keine Rückschlüsse auf die Identität dieser Fraktion zu, da die Erythrozytenmembran des erwachsenen Schweines für Glukose nicht permeabel ist (103). Bei der Chromatographie mit der Makrosäulentechnik wurden drei "Minor"-Komponenten neben einer Hauptkomponente nachgewiesen (103). Sie konnten jedoch mit der TBA-Methode nicht als glykosylierte Hämoglobine identifiziert werden.

FLÜCKIGER et al. (74) wiesen beim Pferd Hb A₁c-analoge Hämoglobine nach. Sie konnten sie in vitro synthetisieren. Ihr Anteil am Gesamthämoglobin ist nicht angegeben. BUNN wies eine Reaktionsfähigkeit des Hämoglobins mit 2,3-DPG nach (30).

4.1. Glykohämoglobine bei der Maus

KOENIG und CERAMI (117) untersuchten die Hämoglobine bei Mäusen (Wildtyp +H) mittels Makrosäulenchromatographie nach TRIVELLI (205).

Das Hämoglobin gesunder Mäuse wies ein Elutionsprofil auf, das dem gesunder Menschen glich. Dem entsprechend wurden die einzelnene Peaks ihrer Reihenfolge nach Hb A₁a+n, Hb A₁c und Hb A genannt.

Der Hb A₁c-Wert gesunder Mäuse betrug $1,74 \pm 0,06$ %. Im Vergleich hierzu wurde bei diabetischen Mäusen (c57 bl/ks - db/db) ein Anstieg des Hb A₁c auf $4,67 \pm 0,23$ % festgestellt.

Die Lebensdauer der Mäuseerythrozyten beträgt 50 Tage. Versuche mit ^{59}Fe -markiertem Hämoglobin von KOENIG und CERAMI (117) lassen den Schluß zu, daß die Glykosylierung des Hämoglobins postsynthetisch geschieht. Nach Auftreten der Hyperglykämie fand der Anstieg des Hb A_{1c} um etwa vier Wochen verzögert statt.

Die Autoren vermuten daher einen humoralen Faktor, der die Glykosylierung beeinflußt.

FLÜCKIGER sieht als Ursache für die verzögerte Reaktion die schlechte Permeabilität der Mäuseerythrozytenmembran an (76).

JAVID et al. (107) trennten das Mäusehämoglobin mittels Makrosäulenchromatographie auf. Im Radio-Immuno-Assay wiesen sie eine dem menschlichen Hämoglobin entsprechende Reaktion der einzelnen Hämoglobinfractionen mit anti-human A_{1c} nach.

Die Reaktivität des Mäuse-Hb A_{1c} war gegenüber dem Human-Hb A_{1c} quantitativ herabgesetzt, was die Autoren vermuten läßt, daß außer dem Glukosemolekül auch Strukturen des Proteins für die spezifische Antigenerkennung übereinstimmen müssen.

4.2. Hämoglobine der Ratte

DAY et al. (51) stellten bei nicht-diabetischen Ratten einen Hb A₁-Wert von 1,21 % bei der Bestimmung mit der Mikrosäulentechnik (Fa. Iso-Lab) und von 1,18 % bei der Bestimmung mit der Makrosäulentechnik fest. Bei diabetischen Ratten lag der Hb A₁-Wert bei 3,5 %.

SACHSE et al. (170) stellten bei Verwendung der Mikrosäulentechnik (Fa. Iso-Lab) einen Hb A₁-Wert von 1,5 % bei Stoffwechselgesunden, bei Alloxan-diabetischen Ratten einen mittleren Hb A₁-Wert von 4,1 % fest.

VIALETTES et al. (208) sahen bei der Untersuchung des Rattenhämoglobins mit Hilfe der Makrosäulentechnik und der isoelektrischen Fokussierung ein Wanderungsbild der Hämoglobinfaktionen, das dem des Menschen ähnlich war. Auch das Verhalten in der Elektrophorese war dem Human-Hämoglobin A₁ entsprechend. Der Anteil der "fast moving hemoglobins" in der Elektrophorese betrug $8,2 \pm 0,3 \%$, bei Streptozotocin-diabetischen Ratten $15,8 \pm 0,8 \%$. Nach der Diabetesinduktion wurde ein schneller Anstieg der "fast moving Hb"-Werte beobachtet. Nach Wiederherstellung der Normoglykämie durch Inselzelltransplantation sinken sie mit zeitlicher Verzögerung wieder in den Normalbereich ab.

4.3. Glykosylierte Hämoglobine bei Hamster, Kaninchen und Rhesusaffe

4.3.1. Glykohämoglobin beim Hamster

LITTLE et al. (132) untersuchten das Hämoglobin des Hamsters (*Mystromys albicaudatus*). Das chromatographische Verhalten des Hämoglobins scheint dem des Menschen nicht zu entsprechen. Es wurde jedoch eine Korrelation der Glykohämoglobine mit der Plasmaglukosekonzentration bei nicht-diabetischen und spontan-diabetischen Hamstern festgestellt. Angaben über den prozentualen Anteil des Glykohämoglobins am Gesamthämoglobin werden von den Autoren nicht gemacht.

4.3.2. Glykosylierte Hämoglobine beim Kaninchen

Beim Kaninchen stellten ERHARDT et al. (70) mittels Mikrosäulentechnik einen mittleren Hb A₁-Wert von $1,32 \pm 0,2$ % fest.

HIGGINS et al. (103) stellten unter Verwendung der Makrosäulenchromatographie einen Hb A₁-Wert von $1,4 \pm 0,3$ % fest. Sie wiesen durch den TBA-Test eine in Ketoaminform gebundene Glukose nach.

CANNON et al. (39) bestimmten mit einer modifizierten Makrosäulentechnik nach TRIVELLI (205) glykosylierte Hämoglobine und fanden ein Elutionsprofil, das dem des Menschen ähnelt.

Sie fanden bei nicht-diabetischen Kaninchen einen mittleren Hb A₁-Wert von $3,9 \pm 1,6$ % und bei spontan-diabetischen einen mittleren Hb A₁-Wert von $12,2 \pm 1,2$ %.

Die Permeabilität der Erythrozytenmembran für Glukose ist im Vergleich zum Menschen um ca. 60 % geringer (103).

Die Überlebenszeit der Erythrozyten beträgt 60 Tage. Im Gegensatz zu Ratten- und Mäusehämoglobin, das je nach Rasse und Stamm zwei oder mehr Hauptkomponenten besitzt, hat das des Kaninchens nur eine Hauptkomponente (103).

4.3.3. Glykohämoglobine beim Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

Bei Untersuchungen des Hämoglobins des Rhesusaffen mit der modifizierten Makrosäulentechnik (4) konnte bei nicht-diabetischen Tieren kein Hb A₁c-Peak festgestellt werden.

Bei Streptozotocin-induziertem oder durch Pankreatektomie hervorgerufenem Diabetes wurden Hb A₁c-Werte von 1,8 - 8,9 % gemessen.

Die chromatographisch isolierte Hb A₁c-Fraktion verhielt sich bei der Elektrophorese dem menschlichen Hb A₁c entsprechend.

Alle Tiere wiesen einen Hb A₁a+b-Peak auf (215).

Die Erythrozytenlebensdauer beträgt etwa 95 Tage.

Das Hämoglobin besitzt nur eine Hauptkomponente (103).

4.4. Glykohämoglobin bei der Katze

Das Hämoglobin der Katze unterscheidet sich wesentlich in seiner Zusammensetzung und Funktion vom Hämoglobin der anderen Tierarten und vom Hämoglobin des Menschen.

LESSARD et al. (130) fanden bei Untersuchungen Hb A₁-Anteile zwischen 47 und 92 % am Gesamthämoglobin. Dabei kommen bevorzugt drei Gruppen mit den Hb A/Hb B-Verhältnissen 1:1; 2,3:1 und 9:1 vor. Dieses Verhältnis ist individuell unterschiedlich, bleibt aber bei ein und demselben Individuum immer gleich. Dieses festgelegte Verhältnis ist auch im Knochenmark und in den Retikulozyten nachweisbar,

was eine genetische Festlegung vermuten läßt (201). Die Ursache dieses Phänomens ist bisher nicht untersucht.

Die beiden Hauptkomponenten Hb A und Hb B besitzen gleiche α -Ketten, unterscheiden sich aber in den β -Ketten. Beim Hb B ist die ϵ -Aminogruppe des N-terminalen Serins von einer Acetylgruppe blockiert (197,198). Da die Aminogruppe die Bindungsstelle für 2,3-DPG ist, ist die Anheftung nicht möglich (5, 135). Daher ist die Sauerstoffaffinität des Hb B geringer als beim Hb A. Insgesamt ist jedoch die Sauerstoffaffinität des Katzenhämoglobins im Vergleich zum Menschen deutlich geringer (199). Außer den beiden Hauptfraktionen lassen sich noch drei weitere Fraktionen ("minor components") auftrennen. Sie ähneln dem Hb B in ihren chromatischen und elektrophoretischen Eigenschaften und werden nach ihrer Elutionsfolge Hb B₁, Hb B₂ und Hb B₃ bekannt. Vermutlich sind sie postsynthetische Modifikationen des Hb B (135).

FLÜCKIGER untersuchte die glykosylierten Hämoglobine der Katze und fand eine Hb A_{1c}-analoge Komponente mittels Chromatographie. Nach Inkubation mit markierter Glukose bildete Hb A zwei und Hb B nur einen schnellwandernden markierten Peak.

Durch die Elektrophorese konnte keine Kettentrennung erreicht werden, die eine Zuordnung der Radioaktivität zur α - bzw. β -Kette ermöglicht hätte (76).

ERHARDT et al. (70) stellten bei der Untersuchung des Hämoglobins mittels Mikrosäulentchnik fest, daß fast keine Trennung erfolgte. Es wurde ein mittlerer Hb A₁-Wert von $95,6 \pm 1,96$ % gemessen. Vermutlich entspricht dieser Wert nur dem Verhältnis der Hauptkomponenten Hb A und Hb B (ca. 9:1).

4.5. Glykohämoglobine beim Hund

Nach elektrophoretischen Untersuchungen des Hundehämoglobins werden unterschiedliche Aussagen über die Homogenität des Hundehämoglobins gemacht (60, 108, 122).

SEAL (183) fand identische Hauptanteile des Hämoglobins. Er erwähnt auch eine "minor"-Komponente, deren Anteil am Gesamthämoglobin etwa 5 bis 10 % beträgt.

Das Hämoglobin des Hundes besteht aus zwei α - und zwei β -Ketten. Die α -Ketten können in zwei Varianten auftreten, die sich dadurch unterscheiden, daß ein Aminosäurerest (Nr. 130) verändert ist.

STENZEL und BRIMHALL (190) sahen trotz 23 Veränderungen in der Aminosäurenfolge der Hämoglobinketten von verschiedenen Carnivoren keine Unterschiede der elektrophoretischen Wanderung. Unabhängig hiervon kann jedoch jeder Aminosäureaustausch zu einer veränderten Funktion des Moleküls führen. Die endständigen Kettensequenzen des Hb A des Hundes sind mit denen des Menschen identisch.

Die gesamte Aminosäuresequenz weist Unterschiede auf. Die α -Ketten des Menschen unterscheiden sich in 23 oder 24 Aminosäuren im Verhältnis zum Hund. Bei den β -Ketten sind 15 Unterschiede zwischen Hund- und Menschenhämoglobin vorhanden (26, 27, 108, 190). BUNN (30) stellte fest, daß das Hundehämoglobin im Vergleich zum Humanhämoglobin eine geringere Sauerstoffaffinität besitzt. Die Reaktion auf 2,3-DPG findet in stärkerem Ausmaß statt.

Die mittlere Überlebenszeit der Erythrozyten wird mit 100 bis 120 Tagen angegeben (103,164,219).

HIGGINS et al. (103) bestimmte die Glukosekonzentration im Erythrozyten nach folgender Formel :

$$G_E = G_P - \frac{G_P - G_{VB}}{HKT}$$

G_E = Glukosekonzentration des Erythrozyten

G_P = Glukosekonzentration im Plasma

G_{VB} = Glukosekonzentration im Vollblut

HKT= Hämatokrit

Er stellte dabei fest, daß die Permeabilität der Erythrozytenmembran für Glukose beim Hund etwa um die Hälfte geringer ist als beim Menschen. Das Verhältnis zwischen Glukosekonzentration des Plasmas und des Erythrozyten beträgt beim Hund 1:2,94 ; beim Menschen 1:1,5.

1978 entwickelten JAVID et al. (107) den Radio-Immuno-Assay mit Antikörpern vom Schaf für die Messung der glykosylierten Hämoglobine des Menschen. Hierbei trennten sie auch vom Hundehämoglobin die Hb A_{1c}-Fraktion mit Hilfe der Makrosäulentechnik ab und testeten sie im RIA. Die Reaktivität entsprach qualitativ derjenigen des Menschen. Quantitativ verlief sie geringer. Größenangaben der Meßergebnisse werden in ihrer Arbeit nicht gemacht.

WOOD und SMITH (218) stellten mittels Makrosäulentechnik erstmals 1980 Hb A₁-Werte fest. Sie untersuchten diabetische und nicht-diabetische Hunde.

MAHAFFEY und CORNELIUS (133,134) stellten eine enge Korrelation zwischen der Makrosäulentechnik und einer kommerziellen Mikrosäulentechnik fest ($r = 0,94$). Die Mittelwerte gesunder, kranker und diabetischer Hunde unterschieden sich signifikant.

SMITH et al. (187) bestimmten die Hb A₁-Komponente mit einer kommerziellen spektrophotometrischen Methode. Die Meßergebnisse wurden von der Hb-Konzentration und der Lagerdauer der Blutproben beeinflusst. Wurden die Störfaktoren ausgeschaltet, korrelierte diese Methode mit der Makrosäulentechnik ($r = 0,96$).

WOOD und SMITH (219) fanden bei Hunden mit Streptozotocin-Alloxan-diabetischen oder pankreatektomierten Hunden eine deutliche Erhöhung der Hb A_{1c}-Werte. Der Anstieg der Hb A_{1c}-Werte erfolgte in den ersten zwei Wochen und erreichte nach etwa 12 Wochen ein Plateau. Die Blutglukosekonzentration korrelierte nicht mit dem Hb A₁-Wert. Die Vorhersage des Hb A₁-Wertes durch ein rechnerisches Modell nach der Diabetes-Induktion stimmte nicht mit den tatsächlich gemessenen Werten überein.

HIGGINS et al. (103) trennten die "minor"-Komponenten mittels Makrosäulenchromatographie ab und erhielten drei "peaks". Die dritte Fraktion mit dem größten "peak" war im Thiobarbitursäuretest (TBA) positiv, die "major"-Komponente TBA-negativ. Daraus wird gefolgert, daß der dritte "peak" das Hb A_{1c} beinhaltet.

JUNG (112) untersuchte mit einer kommerziellen Mikrosäulentechnik (Fa. Iso-Lab) Hundehämoglobin. Eine Erhöhung der Hb A₁-Werte wurde sowohl bei diabetischen als auch bei anderen, an Stoffwechselstörungen erkrankten Hunden festgestellt. Bei Streptozotocin-induzierten diabetischen Hunden fand innerhalb von 12 Tagen ein kontinuierlicher Anstieg von Hb A₁ statt. Eine signifikante Korrelation zwischen Blutglukosegehalt und Hb A₁ konnte nicht festgestellt werden. Mit einem Aldimin-Eliminator wurde die labile Hb A₁-Fraktion abgetrennt. Die

stabile Form des Hb A₁ zeigt nur einen geringen Anstieg, sodaß die Gesamterhöhung des Hb A₁ größtenteils auf die Vermehrung der labilen Phase zurückzuführen ist.

Durch einen Glukoseinfusionsversuch wurde eine Abhängigkeit zwischen den Blutglukosewerten und der Änderung des Hb A₁-Gehaltes gefunden.

Mit der Glukoseinfusion über 24 Stunden konnte jedoch keine Erhöhung der stabilen Phase des Hb A₁ erreicht werden.

Tabelle 3

Literaturangaben über Glykohämoglobine beim Tier

Tierart	Glykohämoglobin (%)		Bestimmungsmethode		Autor
	nichtdiabetisch	diabetisch			
Maus	1,70 $\pm$ 0,06	4,67 $\pm$ 0,23	Makrosäule nach TRIVELLI	KOENIG u. CERAMI (117)	
Ratte	8,2 $\pm$ 0,3	15,8 $\pm$ 0,8	Elektrophorese	VIALETES et al. (208)	
	1,21	3,5	Mikrosäule (IsoLab)	DAY et al. (51)	
	1,18		Makrosäule nach TRIVELLI	" " "	
	1,5	4,1	Mikrosäule (IsoLab)	SACHSE et al. (170)	
	2,9 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 1,2 (1)	Mikrosäule (Boehringer)	SCHMIDT (178)	
Kaninchen		6,6 $\pm$ 1,2 (2)	"	"	
	1,3 $\pm$ 0,25		Mikrosäule (IsoLab)	ERHARDT et al. (70)	
	3,9 $\pm$ 1,6	12,2 $\pm$ 1,2	Makrosäule nach TRIVELLI	CANNON et al. (39)	
	1,4 $\pm$ 0,3		Makrosäule (BioRex)	HIGGINS et al. (103)	
Schwein	3,7 $\pm$ 1,68		Mikrosäule (IsoLab)	ERHARDT et al. (70)	
Schaf	10,5 $\pm$ 1,64		Mikrosäule (IsoLab)	ERHARDT et al. (70)	
Rhesus- affe	1,8 - 8,9		Makrosäule (BioRex)	WIDNESS et al. (215)	
	3,5 $\pm$ 0,9		Makrosäule	HIGGINS et al. (103)	
	5,7 $\pm$ 0,4		Elektrophorese	" " "	

Tierart	Glykohämoglobin (%)		Bestimmungsmethode	Autor
	nichtdiabetisch	diabetisch		
Katze	47 - 92	n	n	
	95,6 ± 1,6	10		
Hund	2,95 ± 0,15	7	Elektrophorese, Makrosäule	LESSARD u. TAKETA (130)
	2,29 ± 0,15	7	Mikrosäule (IsoLab)	ERHARDT et al. (70)
	5,62 ± 0,62	16	Makrosäule (nur Hb A _{1c})	WOOD u. SMITH (218)
	6,43 ± 1,00 (3)	40	Makrosäule (nur Hb A _{1a+b})	" " "
	4,80 ± 0,19	13	Mikrosäule (IsoLab)	MAHAFFEY u. CORNELIUS
	5,10 ± 0,86	25	"	" (134) 1
	2,37 ± 0,44 (4)	4	Makrosäule	SMITH et al. (187) 3
	6,10 ± 1,2 (4)	4	Spektrometrie	" " " 1
	1,99 ± 0,44	13	Makrosäule	" " " "
	2,81 ± 0,35	13	Spektrometrie	" " " "
	3,3 ± 0,60	5	Makrosäule (nur Hb A _{1a+b})	WOOD u. SMITH (219)
	6,1 ± 0,80	7	" (nur Hb A _{1c})	" " " "
	5,56 ± 0,75	45	Makrosäule (nur Hb A _{1c})	HIGGINS et al. (103)
	5,92 ± 0,61 (3)	16	Elektrophorese	" " " "
	7,75 ± 1,61 (5)	10	Mikrosäule (IsoLab)	JUNG (112)
			"	" " "
			"	" " "

(1) - schwach diabetisch; (2) - stark diabetisch; (3) - krank; (4) - hämolytische Anämie; (5) - krank u. vorbehandelt
n = Anzahl der Probanden

5. BESTIMMUNGSMETHODEN

Grundlage der Bestimmungsmethoden ist die Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Hämoglobins, die durch die Glykosylierung hervorgerufen wird.

Mehrere elektrophoretische und chromatographische Methoden kommen nebeneinander zur Anwendung; denn bisher konnte sich kein Verfahren endgültig durchsetzen, da jedes Vorzüge und Mängel beinhaltet. Eine ideale Bestimmungsmethode müßte schnell, billig, einfach und spezifisch anzuwenden sein und dennoch genaue, reproduzierbare Ergebnisse liefern. Da diese Voraussetzungen nur teilweise von den zur Zeit verwendeten Verfahren erfüllt werden, sollen die gebräuchlichen Bestimmungsmethoden kurz vorgestellt werden. Sie werden bezüglich ihrer Vor- und Nachteile miteinander verglichen.

5.1. Elektrophorese

Die elektrophoretische Methode führte zur Entdeckung der glykosylierten Hämoglobine. Infolge unterschiedlicher Dichte wandern die einzelnen Hämoglobinfractionen mit verschiedener Geschwindigkeit im elektrischen Feld (105,106,161). Das elektrophoretische Verhalten der glykosylierten Hämoglobine führte zu der Bezeichnung "schnellwandernde" Hämoglobine (176). Die Elektrophorese wird auf Agar- oder Stärkegeleplatten durchgeführt, wobei mit Hilfe von Pufferlösungen (Nitrat, Tris-EDTA) ein konstanter pH-Wert eingestellt und eine bestimmte elektrische Spannung (60 -200 Volt) angelegt wird. Die einzelnen Fraktionen werden densitometrisch oder nach Färbung und Herausschneiden der gewanderten Fraktion colorimetrisch gemessen (129).

Die Auswertung ergibt die Fraktionen Hb A₁ und Hb A in Prozent des Gesamthämoglobins, wobei auch die Aldiminform (labile Form) des Hb A₁ mit nachgewiesen wird (20).

Hb F kontaminiert die Hb A₁-Fraktion. Andere Hämoglobinvarianten (z.B. Hb S) und ihre glykosylierten Derivate werden abgesondert und können getrennt gemessen werden (142).

5.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Hämoglobinfractionen in einem pH-Gradienten, entsprechend ihren isoelektrischen Punkten (9,127,148,189,214).

Hierzu werden Polyacrylamidplatten mit einem Gehalt von ca. 2 % Ampholine (pH = 6 - 8) verwendet.

Der pH-Gradient wird mit 1 N NaOH-Lösung (Katholyte) und 1 M H₃PO₄ (Anolyte) aufgebaut. Die isoelektrische Fokussierung läuft unter einer Spannung von 1500 V bei 10 - 30 Watt ab. Nach etwa zwei Stunden können die Hb A₁-Spiegel densitometrisch oder spektrometrisch gemessen werden.

Hb A_{1c} wird selektiv bestimmt. Hb A_{1a+b}, Hb A, Hb S und die glykosylierten Hämoglobinvarianten Hb S_{1c}, Hb C_{1c} etc. wandern gesondert (73).

Die Menge des aufgetragenen Hämoglobins ist ein kritischer Faktor, da bei großen Hämoglobinmengen die Auftrennung der einzelnen Fraktionen unscharf wird (144).

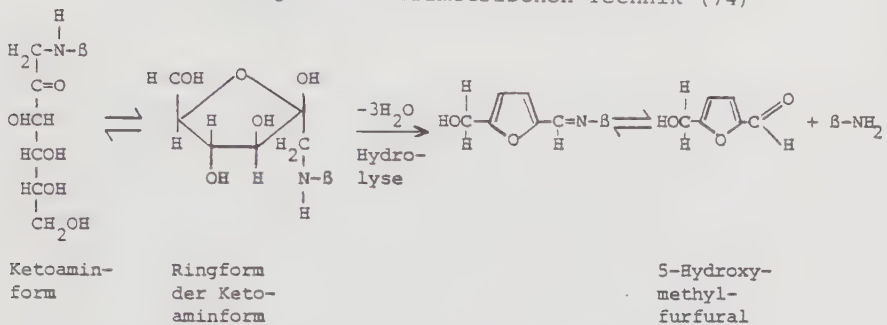
5.3. Radio-Immuno-Assay (RIA)

JAVID et al. (107) bestimmten 1977 die Hb A_{1c}-Fraktion mittels eines Radio-Immuno-Assays. Vom Schaf wurde ein gegen humanes Glykohämoglobin gerichtetes Antiserum gewonnen. Schafhämoglobin reagiert nicht mit 2,3-DPG und hat auch nicht die Konformation der DPG-Bindungsstelle am N-terminalen Ende der β -Ketten, so daß dort keine Glykosylierungsreaktionen stattfinden. Es werden Antikörper produziert, die selektiv Hb A_{1c} in der Ketoaminform präzipitieren. Partielle Kreuzreaktionen mit Hb A_{1a} und Hb A_{1b} sind möglich. Sie beeinflussen die erhaltenen Werte nicht wesentlich, da sie nur 10 % der Reaktionen ausmachen. Zur Messung wird eine Standardkurve aus Hämolysatproben mit bekanntem Hb A_{1c}-Gehalt, der säulenchromatographisch bestimmt wurde, aufgestellt. Die RIA-Technik wurde hauptsächlich zur Bestimmung des Hb A_{1c} beim Neugeborenen, bei dem das vorhandene Hb F die Meßwerte der üblichen Säulentechniken erheblich stört, angewandt (160).

5.4. Colorimetrische Methode

Die colorimetrische Bestimmungsmethode wurde 1976 von FLÜCKIGER und WINTERHALTER (74) entwickelt. Ein in Ketoaminform gebundener Hexoseresest wird hierbei mit schwacher Säure hydrolysiert und als Hydroxymethylfurfural freigesetzt, das mit Thio-barbitursäure (TBA) einen gelben Farbstoff bildet. Die Farbstoffmenge wird bei einer Wellenlänge von 443 nm photometrisch gemessen.

Abb. 3 : Chemischer Reaktionsablauf bei Durchführung der colorimetrischen Technik (74)



Die colorimetrische Methode weist die instabile Form (Aldiminform) des Glykohämoglobins und des Hb F nur in einem vernachlässigbarem Maße nach (154). Die glykosylierten Derivate von Hämoglobinvarianten (z.B. Hb S₁c, Hb D₁c, Hb C₁c) werden jedoch ebenfalls bestimmt. Diese Beeinflussung der Meßwerte kann durch Trennung der Erythrozyten vom Plasma und durch mehrmaliges Waschen verhindert werden. In die Messung gehen ebenso die an anderen Stellen des Hämoglobinmoleküls gebundenen Glukosereste mit ein. Für diese Glukosereste ist die Nachweismethode jedoch weniger empfindlich als für die am N-terminalen Ende der β-Ketten gebundenen Glukosemoleküle (36,72,209).

5.4.1. Durchführung der colorimetrischen Methode

Für die Bestimmung des glykosylierten Hämoglobins mit der colorimetrischen Methode werden von den einzelnen Autoren unterschiedliche Verfahrensabläufe angegeben (1,38,72,83). Sie unterscheiden sich in der zeitlichen Abfolge. Die verwendeten Reagenzien sind lediglich in ihren Konzentrationen unterschiedlich. Prinzipiell verläuft die colorimetrische Bestimmung folgendermaßen :

Die Erythrozyten werden mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und durch Zugabe von Aqua dest. und Tetrachlorkohlenstoff hämolysiert. Dem Hämolysat wird 1 ml 1 N Oxalsäure hinzugefügt und vermischt. Nach einer Inkubationszeit (je nach Autor zwischen 45 min. und 4,5 Std.) bei 100 °C wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gebracht, 1 ml 4%ige Trichloressigsäure (TCA) zur Eiweißpräzipitation hinzugegeben und zentrifugiert. Der klare Überstand wird abgetrennt und mit 0,5 ml 0,05 molarer Thiobarbitursäure (TBA) vermischt. Das Reaktionsgemisch wird bei 40 °C inkubiert. Anschließend wird die optische Dichte bei 443 nm bestimmt. Das Ergebnis kann in optischer Dichte/10 mg Hb (83, 184) ausgedrückt werden oder in % Hb A_{1c} umgerechnet werden, wobei eine OD₄₄₃ von 0,060 1% Hb A_{1c} entspricht.

Da eine Reihe von Störfaktoren auftreten können, ist eine sorgfältige Standardisierung des Untersuchungsganges notwendig. Ein Vergleich von Meßwerten ist bei der colorimetrischen Bestimmungsmethode nur erlaubt, wenn sie unter genau gleichen Bedingungen erhalten wurden (158).

Um exaktere Ergebnisse zu erzielen, wurden einige Modifikationen der colorimetrischen Technik entwickelt.

SUBRAMANIAM et al. (193) entfernten das Häm und das Eisen aus dem Hämolysat, da diese Anteile eine schwarzbraune Farbe bilden, und verwendeten nur das reine Globin. Zur Säurehydrolyse und Bildung des Hydroxymethylfurfurals (HMF) benutzten sie Essigsäure statt Oxalsäure. Durch die Anwendung einer stärkeren Säure wird eine um 40 % erhöhte Menge an HMF freigesetzt. Das gebildete HMF kann mit einem Gemisch aus Phenol und schwefliger Säure anstelle von Thiobarbitursäure nachgewiesen werden (194). Bei dieser Abwandlung der colorimetrischen Methode sind die Maximalwerte für gebildetes HMF nach drei bis vier Stunden erreicht.

Die erhaltenen Werte liegen etwa viermal so hoch wie bei der TBA-Methode, was den analytischen Fehler herabsetzt und zu einer besseren Diskriminierung der Meßwerte (Stoffwechselgesunde und Diabetiker) führt.

5.4.2. Spektrometrische Methode (SPM)

Diese Bestimmungsmethode wird auch als colorimetrische Methode bezeichnet (187). Hierbei wird jedoch die Absorptionsänderung des Hämoglobins, die durch eine Reaktion mit organischen Phosphaten (z.B. 2,3,-DPG) hervorgerufen wird, gemessen. Da die glykosylierten Hämoglobine kein organisches Phosphat anlagern können (siehe 2.3.), ist die Spektraldifferenz umgekehrt proportional zur prozentualen Höhe vom Hb A₁-Gehalt. Hb A₁ wird hierbei als Gesamtfraktion bestimmt (146,187,211).

5.5. Säulenchromatographie

Das Prinzip der Säulenchromatographie beruht darauf, daß bei schwach saurem pH-Wert glykosyliertes Hämoglobin mehr negative Ladungen aufweist als normales Hämoglobin (164).

An eine Kunstharzsäule mit fest gebundenen negativ geladenen Partikeln werden Kationen lose angeheftet. Die glykosylierten Hämoglobine werden mit einer Pufferlösung (pH-Wert 6,7 - 6,8) nach dem Aufbringen des Hämolysats an dieser Kationenaustauschersäule eluiert. Die Elution kann selektiv in einer oder mehreren Fraktionen erfolgen. Das nicht-glykosylierte Hb (Hb A und Hb A₂) bleibt an das Harz gebunden und kann mit einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 6,4 eluiert werden (Abb. 4).

Den Elutionslösungen ist Cyanat zugesetzt, um eventuell vorhandenes Methämoglobin in Cyanhämoglobin zu überführen. Die Messung der Eluate erfolgt spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 415 oder 540 nm (165). Die Menge des glykosylierten Hämoglobins läßt sich dann als prozentualer Anteil des Gesamthämoglobins errechnen, wobei das Gesamthämoglobin die Summe aus glykosyliertem Hb der ersten Elutionsfraktion und dem nicht-glykosyliertem Hb der zweiten Elutionsfraktion ist. Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel :

$$\% \text{ glykos. Hb} = \frac{\text{OD (glykos. Hb)} \times 100}{\text{OD (glykos. Hb)} + \text{OD (nicht-glyk.Hb)}}$$

OD = optische Dichte

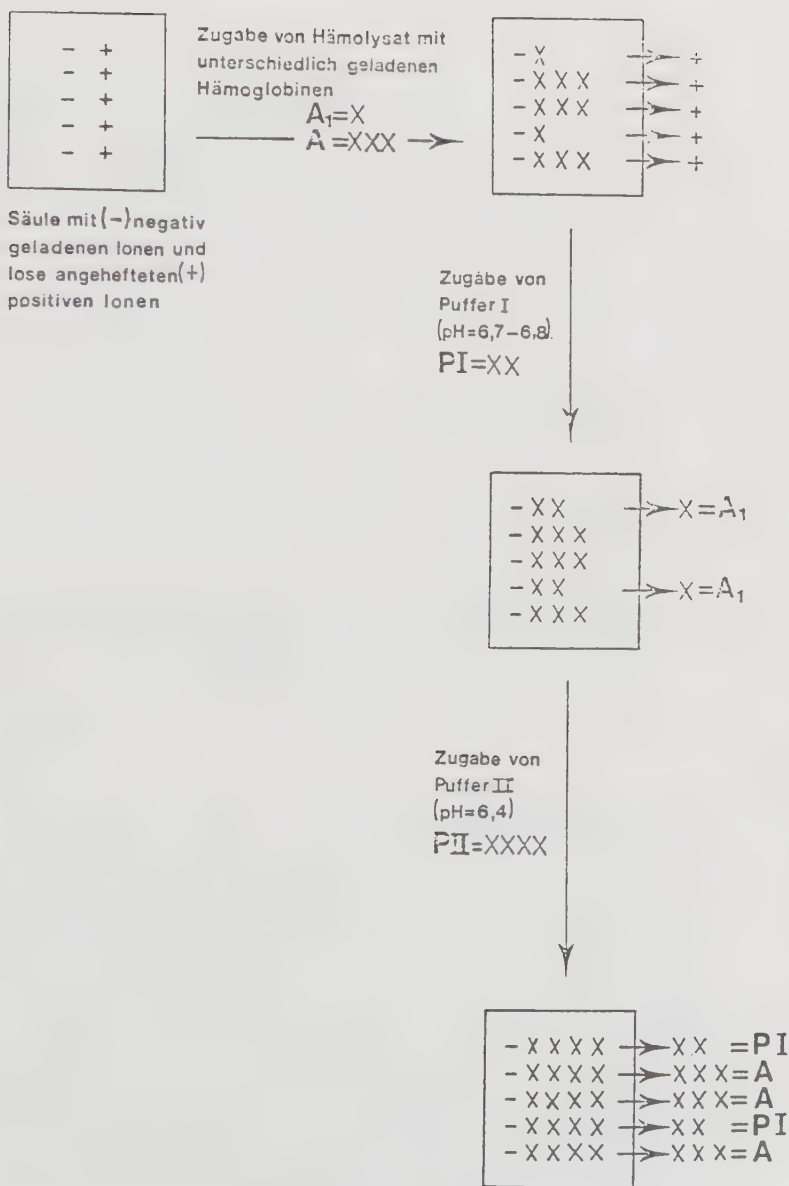


Abb. 4 Prinzip der Kationenaustauscherchromatographie von Hb A₁ (68)

Alternativ kann auf die Elution der nicht glykosylierten Hämoglobine verzichtet werden, wenn im aliquoten Teil des Hämolysats die optische Dichte gemessen wird. Dies führt zu einer Vereinfachung und Verkürzung des Verfahrens. Der prozentuale Anteil des glykosylierten Hämoglobins ergibt sich dann als Quotient der optischen Dichten des Glykohämoglobins und des Gesamthämoglobins (184).

Die Säulenchromatographie wird in zahlreichen Varianten beschrieben. Sie können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden :

- a) die MAKROSÄULENTECHNIK, bei der die schnellwandernden Hämoglobine noch untereinander in die Fraktionen $Hb A_1a$, $Hb A_1b$ und $Hb A_1c$ oder $Hb A_1a+b$ und $Hb A_1c$ aufgetrennt werden können und selektiv der Anteil des $Hb A_1c$ am Gesamthämoglobin bestimmt wird, und
- b) die MIKROSÄULENTECHNIK, bei der die glykosylierten Hämoglobine als Gesamtfraktion gemessen werden ($Hb A_1a+b+c = Hb A_1$).

5.5.1. Makrosäulentechnik

Die Makrosäulentechnik wurde 1971 von TRIVELLI et al. (205) entwickelt. Mit ihr wurden erstmals bei größeren Patientenkollektiven $Hb A_1c$ -Bestimmungen durchgeführt. Es wurden "Bio-Rex-Säulen" (Bio Rad Laboratories, USA) der Größe 2 auf 17,5 cm verwendet. Sie bestehen aus einem schwachen Carboxylattyp-Austauscher, der an eine poröse Acrylsäure gebunden ist. Vor Gebrauch müssen die Säulen mehrere Tage lang mit einer Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 6,7 äquilibriert werden. Die Erythrozyten

der zu messenden Probe werden mit destilliertem Wasser hämolysiert und über Nacht bei 4 °C gegen die oben erwähnte Pufferlösung dialysiert. Die Elution der schnellwandernden Hämoglobine, in der Reihenfolge Hb A_{1a}, Hb A_{1b} und Hb A_{1c} aus 2 bis 3 ml Hämolysat findet bei Zimmertemperatur mit 225 - 250 ml Pufferlösung in zwei bis drei Stunden statt. Das übrige Hämoglobin wird dann mit einer zweiten Phosphatpufferlösung eluiert.

Die Konzentrationen werden am Photometer bei einer Wellenlänge von 552 nm gemessen.

Eine Wiederverwendung der Säulen ist nach sechsstündiger Reäquilibration mit dem Elutionspuffer möglich.

Bei der Makrosäulentechnik wird sowohl durch die vorausgehende Dialyse als auch durch die lange Dauer des Verfahrens, während dessen ebenfalls ein dialytischer Effekt auftritt, die Glukosebindung an das Hämoglobin in der Aldiminform rückgängig gemacht.

Daraus ergibt sich, daß nur die stabile Form des Hb A_{1c}, also die Ketoaminform, gemessen wird. Sie hat zur Beurteilung der Stoffwechsellage mehr Aussagekraft, da sie keinen kurzfristigen Blutzuckerschwankungen unterliegt.

5.5.2. Mikrosäulentechnik

Da die Makrosäulentechnik einen beträchtlichen Zeit- und Materialaufwand beansprucht, wurden eine Reihe modifizierter Verfahren entwickelt (44,50,101). Sie erreichen durch Verkleinerung der Säulen, Reduzierung des benötigten Hämolysats auf μ l-Bereiche und die Verminderung der Elutionsvolumina eine erhebliche Zeitersparnis. Außerdem ermöglichen sie die Verwendung von kapillärem statt venösem Blut. Zu Untersuchungen sind nur geringe Blutmengen erforderlich, sodaß die Blutentnahme beim Menschen aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen erfolgen kann. Die aufwendigere Venenpunktion kann umgangen werden (56,184,213).

Im allgemeinen werden die schnellwandernden Häoglobine als eine Fraktion eluiert. Es wird also nicht mehr selektiv Hb A₁c bestimmt.

Die unterschiedlichen Mikrosäulentechniken lassen sich in drei Gruppen unterteilen :

KYNOCH und LEHMANN (124) entwickelten eine Mikroform der Makrosäulentechnik, bei der fast die gleichen Reagenzien wie bei TRIVELLI (205) verwendet werden. Ein Kationenaustauscher (Bio-Rex 70, 200 - 400 mesh) wird mit einem Puffer von pH 6,8 äquilibriert. Das aufgetragene Hämolysat wird mit 100 ml Pufferlösung eluiert. Der Rest des Häoglobins wird mit 100 ml eines anderen Puffers (pH 6,4) eluiert. Die Dauer des Elutionsvorgangs beträgt etwa 2,5 Stunden.

Die optische Dichte beider Fraktionen wird bei 415 nm bestimmt. Das Verfahren kann verkürzt werden, indem man die Fraktion des nicht-glykosylierten Häoglobins nicht eluiert, sondern direkt die Messung der optischen Dichte des Gesamthäoglobins vornimmt (42).

Durch eine Reduzierung der unterschiedlichen Puffermengen, die sich bei den verschiedenen Verfahren hauptsächlich in ihrer Ionenzusammensetzung, weniger im pH-Wert unterscheiden, kann die Hb A₁-Bestimmung auf weniger als eine Stunde verkürzt werden (131,213).

Eine weitere Verkürzung des Verfahrens erreichten DAVIS und NICOL (49), in dem sie die Elution der Hb A₁-Fraktion unter Zentrifugation (150 - 200 g eine Minute lang) ablaufen lassen. Dadurch dauert die Bestimmung einer Probe nur noch 5 Minuten. Eine Verkürzung der Elutionszeit führt jedoch dazu, daß die gemessenen Hb A₁-Werte zu hoch ausfallen.

Es wird von RYALL eine Mindestelutionszeit von 10 Minuten gefordert, um eine zufriedenstellende Trennung der Hämoglobine zu erreichen (167).

Auch mit der Mikromethode ist es möglich, selektiv Hb A₁c zu bestimmen. Durch fortlaufende Registrierung der optischen Dichte des Eluats werden die beiden Fraktionen Hb A₁a+b und Hb A₁c entsprechend der jeweiligen Spitzenwerte voneinander getrennt (136). Dieses Verfahren wurde bis zu einer halb-automatischen Anlage weiterentwickelt (143).

Andere Autoren (81,82) verwenden drei unterschiedliche Pufferlösungen, die erste zur Elution von Hb A₁a+b, die zweite zu der von Hb A₁c und die dritte für das Resthämoglobin.

5.5.3. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Die "high pressure liquid chromatography" entspricht prinzipiell den anderen Säulentechniken. Bei der Eluierung wird durch Druckanwendung der Durchfluß der Pufferlösungen wesentlich beschleunigt. Die Säulen sind 0,9 x 5 cm groß. Der Druck beträgt 50 - 350 p.s.i. (pounds/square inch; 100 p.s.i. = 6,8 bar). Die Elution dauert nur 20 bis 27 Minuten, wenn die glykosylierten Hämoglobine in zwei Fraktionen (Hb A₁a+b und Hb A₁c) eluiert werden. Wird eine Gesamtfraktion eluiert, verringert sich die Elutionszeit auf 11 Min. (45, 204). Der Nachteil der HPLC-Technik ist die kosten- aufwendige Apparatur.

5.5.4. Kommerzielle Kits

Mit der zunehmenden Bedeutung der Stoffwechsel- überwachung des Diabetikers in der Humanmedizin mittels Glykohämoglobin sind "kits" auf den Markt gebracht worden. Im Gegensatz zu den Makrosäulen, die man vorbereiten muß, sind sie sofort verwend- bar. Sie enthalten Kationenaustauschersäulen, die zum einmaligen Gebrauch bestimmt sind, sowie Häm- olysereagenz und Pufferlösungen. Das genaue Ver- fahren wird unter 7.3. beschrieben.

5.5.5 Störfaktoren bei der Mikrosäulenmethode

Eine Reihe von Störfaktoren können die Resultate bei der Bestimmung mit der Mikrotechnik beeinflus- sen.

1. Temperatur

Es wurde beobachtet, daß die gemessenen Hb A₁-Werte von der Umgebungstemperatur abhängig sind (86,173,184). Bei zunehmender Temperatur wird teilweise nicht-glykosyliertes Hämoglobin eluiert, so daß hierdurch höhere Werte gemessen werden. Bei niedriger Temperatur wird der Hb A₁-Wert geringer, da ein Teil des glykolysierten Hämoglobins in der Säule zurückgehalten wird (149). Deshalb ist bei der Mikrosäulenteknik eine konstante Umgebungstemperatur erforderlich bzw. wird ein Temperaturoptimum angegeben, bei dem die beste Trennung zwischen den Hämoglobinfractionen erfolgt. Bei den kommerziellen kits wird aus diesem Grunde mit einem Temperiergestell gearbeitet.

2. pH-Wert

Um eine exakte Trennung der Hämoglobinfractionen zu erreichen, muß der pH-Wert der Elutionspufferlösungen konstant gehalten werden. Schwankungen des pH-Wertes führen zu Verfälschungen der Hb A₁-Werte (43,183).

Höhere pH-Werte führen zu einer schnelleren Elution des Hb A₁, während bei einem niedrigeren pH-Wert das glykosylierte Hämoglobin länger in der Säule zurückgehalten wird. Eine Differenz von 0,04 pH-Einheiten gegenüber dem pH-Optimum bewirkt bereits Schwankungen von 8 % (213). Ein einheitliches pH-Optimum kann nicht angegeben werden. Es ist abhängig von der Methode und den dabei verwendeten Pufferlösungen (43,213).

3. Ionenzusammensetzung, Molarität

Außerdem haben Schwankungen in der ionalen Zusammensetzung und der Molarität der Elutionspufferlösungen einen Einfluß auf den Hb A₁-Meßwert (109, 167, 184).

4. Beschaffenheit der Säulen , Elutionszeit

Als mögliche Störfaktoren kommen die Packungsdichte und Zusammensetzung der Säulen sowie die Elutionszeit in Betracht (86, 167, 173, 213).

5. Pathologische Blutzusammensetzung

Beim Menschen beeinflußt ein erhöhter Hb F-Gehalt bzw. eine Hämoglobinanomalie (Hb S, Hb C, Hb D, Hb H, Hb J) ebenfalls die Messung der glykosylierten Hämoglobine (32, 203).

Zusammenfassend gilt für die Durchführung der Hb A₁-Bestimmung, daß ein konstantes Arbeitsschema verfolgt werden muß, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

5.6. Methodische Vergleiche der Bestimmungsmethoden

Aus der Vielzahl der vorhandenen Bestimmungsmethoden und deren Modifikationen mit ihren Vorzügen und Mängeln kann keine als beste Methode angegeben werden. Für die Verwendung der jeweiligen Technik spielen neben der zu messenden Hämoglobinfraction auch der notwendige Aufwand an Kosten und Zeit sowie die Automatisierbarkeit eine Rolle. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Techniken sind zudem nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Hämoglobinfractionen bestimmt werden :

Die isoelektrische Fokussierung und der Radio-Immuno-Assay messen selektiv Hb A_{1c} in der Ketoaminform; bei der Makrosäulentechnik und der HPLC wird ebenfalls Hb A_{1c} bestimmt, das jedoch durch Hb F kontaminiert sein kann. Die Mikrosäulentechniken messen Hb A₁ als Gesamtfraction, Hb F und andere schnellwandernde Hämoglobinemoleküle (Hb J, Hb H), sodaß bei den Mikrosäulentechniken besser von "fast moving hemoglobins" gesprochen werden sollte (23).

So liegen z.B. die Normalwerte für Hb A_{1c}, die mit der HPLC bestimmt wurden, um 20 % höher als die mit der Makrosäule bestimmten (94).

Bisher ist noch keine Bestimmungsmethode als absolut spezifisch und zuverlässig anerkannt. Die Makrosäulentechnik nach TRIVELLI (205) ist jedoch allgemein als Referenzmethode anerkannt, da ein Vergleich mit anderen Meßtechniken zu hochsignifikanten Korrelationen führte. Für klinische Routineuntersuchungen ist sie jedoch auf Grund ihres großen Zeitaufwandes nicht geeignet. Die Präzision und Zuverlässigkeit einer neu entwickelten Bestimmungsmethode wird vorzugsweise im Vergleich mit dieser Technik beurteilt (139,172,220).

5.7. Häufigkeit der verwendeten Methoden

Die Makrosäule wird heute nur noch zu Forschungszwecken oder als Vergleichsmethode bei der Erprobung und Überprüfung neuentwickelter Techniken verwendet.

Die Elektrophorese, die isoelektrische Fokussierung und der Radio-Immuno-Assay kommen nur in Einzelfällen zur Anwendung.

Die colorimetrische Methode ist sehr preiswert, ihr Zeitaufwand beträgt jedoch sechs bis acht Stunden. Daher wird sie für klinische Routineuntersuchungen nur wenig verwendet. Für die Bestimmung von glykosylierten Proteinen in Plasma und Serum ist sie jedoch die Methode der Wahl.

Häufig verwendet werden die verschiedenen Mikrosäulentechniken, wobei die HPLC auf Laboratorien beschränkt ist, die über die erforderliche, aufwendige technische Ausstattung verfügen.

Für Routinebestimmungen sind die selbstentwickelten und kommerziellen Mikrosäulentechniken sehr verbreitet. Die kommerziellen kits finden besondere Verbreitung bei routinemäßigen Stoffwechselkontrollen, da sie einfach zu handhaben sind und zuverlässige Meßergebnisse erzielt werden können, wenn der Untersuchungsang streng standardisiert ist.

Tab. 4

ÜBERSICHT ÜBER VOR- UND NACHTEILE DER BESTIMMUNGSMETHODEN

Methode	Mittelwerte gesunder Individuen (Mensch)	Vorteile	Nachteile	Zeitbedarf (Elutions- bzw. Reaktionszeit)
<u>Chromatographie</u>				
1. Makrosäule	$6,5 \pm 1,5$ % (205) nur Hb A _{1c} : $4,9 \pm 0,8$ % (103)	gute Trennung wiederverwend- bare Säulen	relativ große Blut- mengen, lange Elutionszeit, Kontamination mit Hb F	2 - 3 Stunden
2. Mikrosäule	$7,0 \pm 0,9$ % (82)	geringe Blutmenge kurze Elutionszeit relativ billig wiederverwendbar	geringe Trennschärfe nur Hb A ₁ -Bestimmung möglich	2 Stunden
3. Mikrosäule mit Zentrifugation (49)		siehe 2.	schlechte Trennung	5 Minuten
4. High Pressure Liquid Chromatography	nur Hb A _{1c} : $5,6 \pm 0,7$ % (50)	gute Trennschärfe kurze Elutionszeit geringe Blutmengen	aufwendige Spezial- apparaturen erforderlich	11 - 45 Minuten

Fortsetzung Tab. 4 :

Methode	Mittelwerte gesunder Individuen (Mensch)	Vorteile	Nachteile	Zeitbedarf (Elutions- bzw. Reaktionszeit)
Chromatographie				
5. Kommerzielle Kits	6,15 ± 1,5 % (14)	geringe Blutmengen kurze Elutionszeit Säulen sofort ver- wendbar	geringe Trennschärfe	30 Minuten
Colorimetrie				
		einfache Durch- führung	schlechte Reprodu- zierbarkeit, Messung anderer glykosylierter Hämö- globine	Gesamtreaktion ca. 8 Stunden - 52 -
Elektrophorese				
	6,7 ± 0,7 % (103)	gute Trennschärfe	Spezielle Ein- richtungen erforder- lich	1/2 - 2 Stunden
Isoelektrische Fokussierung (IEF)				
		Hb F kann von Hb A _{1c} getrennt werden	Spezielle Einrichtungen erforderlich	2 Stunden
Radio immuno assay (RIA)				
		Hb F kann von Hb A _{1c} getrennt werden	RIA-Einrichtung erforder- lich, geringe Kreuzreaktionen möglich	

6. ZIELSETZUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Verhalten der glykosylierten Hämoglobine als Feldstudie beim Hund unter verschiedenen physiologischen, pathologischen und therapeutischen Zustandsbildern untersucht werden.

Bei scheinbar oder effektiv von der Norm abweichenden Hb A₁-Werten sollten nach Möglichkeit Verlaufsuntersuchungen durchgeführt werden. Außerdem sollte im Ausblick die medizinische Relevanz der Hb A₁-Bestimmung beim Hund für den praktischen Tierarzt beurteilt werden.

7. MATERIAL UND METHODIK

7.1. Patientenmaterial

Von 166 Hunden beiderlei Geschlechts, unterschiedlichen Alters und Gesundheitszustandes sowie verschiedener Rassen wurden insgesamt 222 Blutproben auf ihren Hämoglobin-, Hb A₁- und Blutzuckergehalt untersucht.

Die Tiere waren ambulante und stationäre Patienten einer Kleintierklinik in Norddeutschland. Sie wurden nach den Kriterien "Nicht-Diabetiker" und "Diabetiker" aus dem Patientengut ausgewählt. Unter Berücksichtigung der Anamnese, der Befunde der klinischen Untersuchung sowie der röntgenologischen oder/und hämatologischen Untersuchung wurde eine Gruppeneinteilung vorgenommen.

7.1.1. Gruppe A : Gesunde Hunde

In dieser Gruppe sind 58 Hunde zusammengefaßt, bei denen weder anamnestisch noch klinisch oder durch die hämatologische Untersuchung ein Hinweis auf eine unphysiologische Stoffwechselsituation gegeben war.

7.1.2. Gruppe B : Hunde mit Fieber und Leukozytose

Diese Gruppe umfaßt 15 Hunde, bei denen eine erhöhte Körpertemperatur von mehr als 39,2 °C (153) und eine Leukozytose von mehr als 12000 Leukozyten/ μ l (119) vorlag.

7.1.3. Gruppe C :

Hunde mit Umfangsvermehrungen bzw. Tumoren der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems

In dieser Gruppe sind 11 Hunde zusammengefaßt, bei denen eine tumoröse Entartung der Leber, der Milz oder eine Erkrankung des leukopoetischen Gewebes (Leukose) vorlag. Die Diagnosestellung erfolgte aufgrund klinischer, röntgenologischer und hämatologischer Befunde (Organvergrößerungen, Leukozytose). In einigen Fällen wurde eine diagnostische Laparatomie durchgeführt. Biopsien der erkrankten Organe konnten aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

7.1.4. Gruppe D : Hunde mit einer Anämie

In dieser Gruppe sind 10 Hunde aufgeführt, bei denen nach der klinischen und hämatologischen Untersuchung die Diagnose "Anämie" gestellt wurde. Als Parameter für die Diagnosestellung wurde eine Verringerung der Normwerte für Hämoglobin und/oder Erythrozyten um 30 % zugrunde gelegt.

Als Grenzwert für den Hämoglobingehalt wurden 10,5 g/dl (Normalbereich : 15 - 19 g/dl(119)) festgelegt. Ein Erythrozytengehalt von $3,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ wurde als Bemessungsgrundlage für den anämischen Blutstatus festgelegt (Normalbereich : $5,5 - 8,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ (119)).

7.1.5. Gruppe E : Hunde mit Erkrankungen der Leber

In Gruppe E sind 6 erwachsene Hunde mit Erkrankungen der Leber zusammengefaßt. Zur Diagnosestellung wurden die Befunde der klinischen, röntgenologischen und Blut- und Serumuntersuchung herangezogen. Die Bemessungsgrundlage bilden die Befunde der Serumuntersuchung. Als Grenzwert wurde eine Aktivität von mehr als 50 IU/l der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) oder eine Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) von mehr als 190 IU/l festgelegt (119).

7.1.6. Gruppe F : Hunde mit dem Verdacht auf Erkrankungen des exkretorischen Pankreas

Diese Gruppe umfaßt 6 Hunde, bei denen aufgrund der Anamnese (Polyphagie, Abmagerung, Massenstuhl) und der Befunderhebung bei der klinischen, röntgenologischen (Aufgasungen des Duodenums) und Serumuntersuchung die Verdachtsdiagnose "Erkrankung des exkretorischen Teils des Pankreas" gestellt wurde. Als Grenzwert des Normbereichs wurde ein α -Amylase-Wert von 1650 IU/l und ein Lipasewert bis 300 IU/l betrachtet (119).

Die Patienten zwigten eine Besserung ihres Allgemeinzustandes unter der Medikation von Pankreon^R.

7.1.7. Gruppe G : Hunde mit Erkrankungen der Niere

Diese Gruppe umfaßt 15 Hunde, bei denen eine Nephropathie diagnostiziert wurde. Bemessungsgrundlage zur Gruppeneinteilung war ein Kreatinin-Pikrat-Wert von mehr als 1,8 mg/dl (Normalwert : bis 1,6 mg/dl(52)) oder ein Serumharnstoffwert von mehr als 80 mg/dl (Normalwert : 20 - 50 mg/dl(52)).

7.1.8. Gruppe H : Hunde mit einer Pseudogravidität

In dieser Gruppe sind 6 weibliche Hunde aufgeführt, bei denen nach einer normal verlaufenen Läufigkeit klinisch Anzeichen einer hormonellen Fehlregulation in Form einer Scheinträchtigkeit mit Lactatio falsa auftraten. Die Befunde der röntgenologischen und/oder hämatologischen Untersuchung lagen innerhalb der physiologischen Norm.

7.1.9. Gruppe I : Mit Glucocorticoiden vorbehandelte Hunde

Diese Gruppe faßt 9 Hunde zusammen, die aufgrund unterschiedlicher Indikationen zum Zeitpunkt der Hb A₁-Bestimmung mit Dexamethason (Voren^R) oder Triamcinolon (Volon^R) vorbehandelt worden waren.

7.1.10. Gruppe K : Hunde mit einer Herzerkrankung und einer Herzglykosidbehandlung

In dieser Gruppe sind 9 Hunde aufgeführt, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt waren. Pathologische Befunde bei der Herzauskultation (systolische oder diastolische Herzgeräusche) waren neben klinischen Symptomen das Einteilungskriterium dieser Gruppe. Alle 9 Hunde waren mit dem Lanata-Präparat β -Methyl-digoxin unterschiedlich lange vorbehandelt.

7.1.11. Gruppe L : Diabetische Hunde

In dieser Gruppe sind 19 Hunde zusammengefaßte, bei denen ein Diabetes mellitus vorlag. Als Beurteilungskriterien wurden anamnestische Angaben (Polydipsie, Polyurie), Glucosurie und ein Nüchternblutzuckerspiegel von mehr als 140 mg/dl (Normalwert : 55 - 110 mg/dl (119) bei der Erstuntersuchung festgelegt.

Bei 10 in dieser Gruppe aufgeführten Hunden wurden Verlaufsuntersuchungen durchgeführt, um eine Therapiekontrolle zu ermöglichen. Die Hunde wurden alle ambulant überwacht. Die Behandlung erfolgte durch den Besitzer, der nach Anweisung täglich einmal Insulin subkutan injizierte. Verwendet wurde ausschließlich Long-Insulin^R.

Die Einstellung der Dosis erfolgte sowohl nach dem Blutzuckergehalt als auch nach dem Ausmaß der Polydipsie und dem Ergebnis von Urintests, die von den Besitzern selbst durchgeführt wurden.

7.2. Probenmaterial

Alle Blutproben wurden aus der Vena cephalica antebrachii entnommen.

1,0 ml Vollblut wurde in Kunststoffeinmalspritzen aufgenommen. Als Gerinnungshemmer war Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) zugesetzt.

Die Glukosebestimmung erfolgte enzymatisch unmittelbar nach der Blutentnahme im Praxislabor (siehe 7.3.1.).

Die Hb A₁-Bestimmung wurde in einem entsprechend ausgerüsteten Krankenhauslabor durchgeführt.

Aus praxistechnischen Gründen war die Bestimmung nur 1 - 2 mal wöchentlich möglich. Die Proben wurden nach der Entnahme im Kühlschrank bei 4 - 8 °C bis zur chromatographischen Auswertung aufbewahrt. Die Hb A₁-Bestimmung wurde innerhalb von 6 Tagen nach der Entnahme durchgeführt.

Bei den Verlaufsuntersuchungen der Diabetiker wurde das entnommene Vollblut in end-to-end Capilletten (50 µl) aufgezogen und mit dem Hämolysereagenz der Hb A₁-Test-Combination (siehe 7.3.2.) sofort nach der Entnahme hämolysiert.

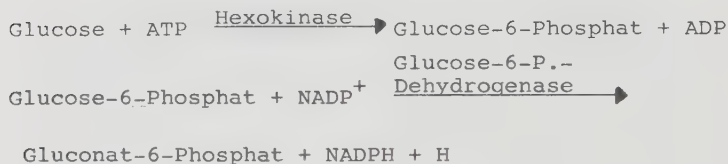
Das Hämolysat wurde bis zur Hb A₁-Bestimmung im Kühlschrank maximal 24 Stunden aufbewahrt. Eine längere Lagerzeit wurde vermieden, um Meßfehler durch eine Glykosylierung des Hämoglobins in vitro während der Lagerung zu verhindern.

7.3. Analytische Methoden

7.3.1. Enzymatische Bestimmung der Glukose

Die Blutzuckerbestimmung erfolgte mit der Test-Combination "Gluko-quant" (Fa. Boehringer Mannheim).

Das Testprinzip beruht auf folgender enzymatischer Reaktion :



0,01 ml Vollblut werden mit 1,0 ml Hämolyse-reagenz gut vermischt.

In das Hämolysat werden 2,0 ml der Reaktions-lösung 1 (Phosphat-Puffer 35 mmol/l, pH 7,6; Mg SO₄ 2 mmol/l; ATP 0,65 mmol/l) pipettiert. Die Extinktion dieses Reaktionsgemisches wird gegen Luft bei einer Wellenlänge von 365 nm ge-messen (= E₁).

0,02 ml der Reaktionslösung 2 (Hexokinase -100 U/ml; Glucose-6-6Phosphat-Dehydrogenase - 180 U/ml) werden anschließend hinzupipettiert.

Nach Ablauf der Reaktionszeit von 5 bis 30 Minu-ten wird die Extinktion gemessen (= E₂), ebenfalls bei 365 nm.

Aus den Meßwerten wird ΔE errechnet :

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

Über ΔE ist mit der testeigenen Wertetabelle der Blutglukosegehalt in mg/100 ml bzw. mmol/l zu bestimmen. Die angegebenen Blutzuckerwerte sind Nüchternblutzuckerspiegel.

Die Extinktionsmessungen erfolgten im Praxislabor photometrisch (Photometer Fa. Max Reile, Berlin).

7.3.2. Mikrosäulenchromatographische Bestimmung von Hämoglobin A_1

Zur mikrosäulenchromatographischen Bestimmung der Hb A_1 -Konzentration wurde die "Test-Combination Hb A_1 " (Fa. Boehringer Mannheim) verwendet (13). Sie besteht aus einem Hämolyse-Reagenz, zwei Elutionspufferlösungen (Phosphatpuffer, Natriumchlorid) und Säulen mit Kationenaustauscherharz zum einmaligen Gebrauch.

Die Bestimmung wird bei einer konstanten Temperatur von 23 °C durchgeführt. Die Säulen werden dazu in ein spezielles Temperiergestell verbracht.

1. Probenvorbereitung

Zur Herstellung des Hämolysats werden

0,2 ml Hämolysereagenz und

0,05 ml Vollblut bzw. EDTA-Blut in einem Reagenzglas miteinander vermischt und 10 Minuten bei zweimaligem Schütteln stehengelassen.

Das Hämolysat ist bei 2 - 8 °C sechs Tage haltbar.

2. Säulenvorbereitung

- a) Die Säulen werden 15 Minuten vor Beginn des Elutionsvorganges in das auf 23 °C erwärmte Temperiergestell verbracht.

- b) Säulen öffnen und die Tropfgeschwindigkeit von 6 Tropfen pro Minute kontrollieren.
- c) Oberes Abschlußplättchen (Fritte) mit einem Glasstab oder einem an beiden Enden offenen Glasröhrchen bis an das Säulenbett drücken. Hierbei müssen kleinere Luftblasen unterhalb der Fritte vorsichtig beseitigt werden.
- d) 50 μ l Hämolysat werden direkt auf die Fritte aufgetragen. Ihr vollständiges Eindringen muß abgewartet werden.
200 μ l Elutionslösung Nr. 2 (Phosphatpuffer) werden an die Wandung der Säule pipettiert.
Das Eluat wird verworfen.

3. Elution der "schnellwandernden" Hämoglobine
4 ml der Elutionslösung Nr. 2 werden auf die Fritte pipettiert. Das Eluat wird gesammelt und anschließend innerhalb von 30 Minuten photometrisch seine Extinktion (E_1) bestimmt.

4. Bestimmung des Gesamthämoglobins

0,05 ml Hämolysat,

4,0 ml Elutionslösung Nr. 3 (Natriumchlorid) und 15,0 ml destilliertes Wasser werden in ein Reagenzglas pipettiert und vermischt.

Die Extinktion dieses Gemisches wird anschließend photometrisch gemessen (E_2).

5. Messung und Berechnung

Die Extinktion beider Fraktionen wird bei 415 nm im Spektralphotometer (Fa. Zeiss) gemessen.

Die Messung erfolgt gegen destilliertes Wasser als Leerwert in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke.

Die Berechnung der Hb A_1 -Werte erfolgt mit der Formel :

$$\frac{E_1 \times 100}{4,7 \times E_2} = \% \text{ Hb } A_1$$

6. Qualitätskontrolle

Die Durchführung der Chromatographie wurde mit Humanhämolysaten mit bekanntem Hb A₁-Gehalt von Nichtdiabetikern und Diabetikern überprüft ("Hb A₁-Control", Fa. Boehringer Mannheim).

Um Einflüsse der Routinierung in der labortechnischen Durchführung und jahreszeitliche Einflüsse zu erkennen, wurden die Meßergebnisse einzelner Bestimmungsläufe im Verlauf eines Jahres protokolliert.

Aus praxisorganisatorischen Gründen konnte die Chromatographie nur 1 - 2 mal wöchentlich durchgeführt werden. Daraus resultierte in einigen Fällen eine Lagerung der Blutproben für 1 - 6 Tage im Kühlschrank bei 4 - 8 °C. Um mögliche Einflüsse der Lagerzeit auf den gemessenen Hb A₁-Wert zu erkennen, wurde die Lagerzeit protokolliert und in die Qualitätskontrolle mit einbezogen. (vgl. 8.13., Abb. 14 und 15)

7.4. Statistische Methoden

Die Meß- und Rechenergebnisse wurden als Einzelwerte und , wenn möglich, als Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichung ($\pm s$) und Standardfehler ($\pm \text{sem}$) wiedergegeben.

Die einzelnen Gruppenmittelwerte wurden im Rahmen eines Varianzvergleichs mit Hilfe des T-Tests auf ihre Signifikanz überprüft.

Die Pearson-Produkt-Moment-Korrelation wurde in den einzelnen Gruppen zwischen den Hb A₁-Werten und den Bemessungsgrundlagen der einzelnen Gruppen berechnet. Die Ergebnisse wurden als "signifikant" angesehen, wenn $p \leq 0,05$, als "hoch signifikant", wenn $p \leq 0,01$ war.

8. ERGEBNISSE

8.1. Hämoglobin A₁ bei gesunden Hunden (Gruppe A)

Der Normalwertbereich für Hb A₁ wurde durch die Untersuchung von 58 Hunden ermittelt.

Die Tiere zeigten bei der klinischen Untersuchung keine von der physiologischen Norm abweichenden Befunde. Sie wurden lediglich zur Anfertigung von Röntgenaufnahmen, zur Zahnbehandlung (Zahnsteinentfernung, Extraktion persistierender Milchzähne), zur Implantatentfernung nach abgeschlossener Frakturbehandlung, zu kleinen chirurgischen Eingriffen (Entfernung von Wolfskrallen, Entfernung von Warzen), zur Ovariohysterektomie oder Kastration auf Wunsch des Besitzers oder zu einer vorsorglichen Untersuchung vorgestellt.

Die Einzelwerte und Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Weder zwischen Hämoglobingehalt und Hb A₁ ($r = 0,183$; $p = 0,084$) noch zwischen den Blutzuckerwerten und den Hb A₁-Werten ($r = 0,098$; $p = 0,231$) ist eine signifikante Korrelation vorhanden.

Tabelle 5 :

Einzelwerte und Meßergebnisse der Gruppe A

(klinisch gesunde Hunde)

n = 58

Nr.	Rasse	Geschl.	Alter (Jahre)	Hb g%	Hb A ₁ %	BZ mg%
1	Whippet	w	10	19,4	6,06	109
2	Pudel	w	8	17,6	7,34	82
3	Basset	m	6	18,5	4,90	62
4	DSH	m	10	17,0	7,30	81
5	DSH	w	0,3	10,9	6,30	94
6	Boxer	w	2	18,3	5,20	78
7	DSH	m	0,6	17,0	6,70	56
8	LHD	m	2	15,6	6,70	85
9	Pudel	m	7	13,7	7,34	98
10	Rottweil.	m	2	18,0	6,17	63
11	Pudelm.	m	15	14,6	9,87	78
12	DSH	m	2	18,1	6,36	85
13	RHD	m	1	15,4	6,23	46
14	Labrador	w	4	17,1	5,54	55
15	Collie	m	1	17,4	5,45	75
16	Mischlg.	w	7	19,0	7,31	63
17	DD	m	1	17,8	6,00	50
18	Chow	w	1	14,3	6,35	58
19	Mischlg.	m	10	16,9	6,52	109
20	Foxterr.	m	7	16,0	7,15	87
21	Pudel	w	7	18,5	5,43	54
22	DD	m	0,5	15,0	6,35	107
23	RHD	m	7	18,1	7,40	45
24	DSH	m	4	20,0	4,78	72
25	Cocker	m	4	18,3	6,64	128
26	RHD	m	5	14,4	7,15	86
27	Berner S.	m	1	16,1	4,90	89
28	LHD	m	6	16,0	7,00	108
29	Mischlg.	w	0,5	14,5	4,48	50
30	DK	m	0,5	13,8	6,88	109

Fortsetzung Tabelle 5 :

Nr.	Rasse	Geschl.	Alter (Jahre)	Hb g%	Hb A ₁ %	BZ mg%
31	Mischlg.	w	2	17,5	6,28	130
32	DSH	m	2	18,9	4,79	88
33	Yorksh.T.	m	2	17,9	6,22	98
34	DSH	m	4	16,2	6,25	118
35	LHD	m	12	15,9	7,20	69
36	Basset	m	4	18,3	5,47	100
37	Airedale	m	0,5	14,6	6,15	106
38	Pudel	w	10	16,6	7,24	115
39	DL	m	2	17,2	7,39	79
40	Boxer	w	7	18,5	6,90	96
41	Dobermann	w	1	17,1	5,80	90
42	RHD	m	13	15,4	6,00	128
43	Retriever	w	7	18,9	7,66	72
44	Mischlg.	m	6	16,6	7,64	68
45	DSH	m	8	17,4	5,90	103
46	Yorkshire	m	5	19,6	5,67	107
47	Mischlg.	w	6	19,3	5,08	72
48	Kl. Mstl.	w	5	17,4	5,58	108
49	Pudel	m	7	17,7	6,77	107
50	DSH	m	2	16,0	6,66	72
51	Airedale	m	1	15,8	4,92	88
52	Mischlg.	w	3	15,9	5,82	104
53	Yorkshire	w	2	17,9	6,22	98
54	Cocker Sp.	m	8	17,9	7,64	90
55	Pudel	w	1	14,4	4,97	68
56	Kl. Mstl.	m	1	17,0	5,31	88
57	RHD	m	4	18,0	6,13	78
58	DD	w	4	16,4	5,09	45
Mittelwert ($\bar{x}$)			4,57	16,85	6,28	85,29
Standardabweichung			+3,47	+1,75	+0,98	+22,17
Standardfehler			+0,45	+0,23	+0,13	+ 2,91

8.2. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit Fieber und Leukozytose (Gruppe B)

Diese Gruppe umfaßt 15 Hunde im Alter von 6 Monaten bis 13 Jahren.

Krankheitsgeschehen war eine Gastroenteropathie. Nur bei zwei Hunden war eine Verlaufsuntersuchung möglich. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt, in Tabelle 7 als Einzeldaten der Patienten aufgeführt.

Tabelle 6 : Ergebnisse der Gruppe B
(n = 15)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	7,26	4,73	1,22
Hämoglobin (g%)	15,73	3,36	0,87
Hb A ₁	8,63	2,25	0,58
Nüchternblut- blutzucker (mg%)	88,86	20,09	5,19
Leukozyten (x 1000/ μ l)	20,26	7,42	1,91

Eine signifikante Korrelation (r) ergab sich nur zwischen den Hämoglobinwerten und den Hb A₁-Werten.

	r	p
Hämoglobin	0,555	0,016
Nüchternblut- zucker	0,105	0,355
Leukozyten	0,216	0,222

Tabelle 7 Einzeldaten der Gruppe B (Hunde mit Fieber und Leukozytose)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Leukozyten (x/ul)	Temperatur °C
Bemessungsgrundlage								39,2
1	RHD	m	12	14,8	10,12	106	41600	40,0
2	Pudel	m	5	16,0	12,60	98	5400	41,5
				14,4	14,5	83	23200	40,0
				18,9	11,3	56	13200	39,0
3	DSH	m	0,5	12,5	5,35	81	16400	41,3
4	DK	w	9	16,4	9,70	85	23400	39,6
				16,8	8,33	57	17400	39,0
5	Chow	m	1	11,0	5,66	48	17200	39,9
6	DL	m	13	17,6	11,70	108	20800	39,9
7	LHD	w	1	11,4	6,15	108	14000	39,8
8	DSH	w	4	19,6	8,01	67	16800	40,2
9	Basset	w	7	16,9	8,95	94	24000	39,8
10	DSH	m	9	20,3	8,27	85	13800	40,8
11	LHD	w	8	13,6	8,08	107	29200	39,9
12	DSH	w	6	12,2	6,93	128	23200	39,6
13	RHD	m	14	18,7	7,44	85	13400	40,0
14	Misch.	w	13	13,0	9,22	80	17800	39,8
15	DSH	m	12	21,3	11,86	86	21400	41,0

8.3. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit Umfangsvermehrungen bzw. Tumoren der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems

In dieser Gruppe sind 10 Hunde erfaßt, bei denen eine Umfangsvermehrung bzw. ein Tumor der Milz oder der Leber diagnostiziert wurde oder eine Erkrankung des leukopoetischen Systems (Leukose) vorlag. Die Diagnosestellung erfolgte aufgrund der klinischen, röntgenologischen und serologischen Befunde und/oder anlässlich einer diagnostischen Laparatomie.

In zwei Fällen wurde eine pathohistologische Untersuchung durchgeführt (Hund Nr. 2, 9). Ein Patient konnte über einen Zeitraum von 191 Tagen verfolgt werden. Er wurde nach der Verdachtsdiagnosestellung "Leukose" aufgrund klinischer (allgemeine Lymphknotenvergrößerung, rezidivierendes Fieber) und röntgenologischer Befunde (Verschattungen an der Herzbasis und im Mediastinum) mit Zytostatika (Leukeran^R) behandelt. In diesem Fall war keine pathohistologische Abklärung möglich (Hd. Nr.10). Bei 8 Hunden lag eine deutliche Leukozytose vor. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Die Einzeldaten gibt Tabelle 9 wieder.

Tabelle 8 : Ergebnisse der Gruppe C
(n = 10)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	7,90	3,53	1,06
Hämoglobin (g%)	12,57	3,46	1,09
Hb A ₁ (%)	7,46	2,75	0,87
Nüchternblutzucker (mg%)	81,20	10,18	3,22
Leukozyten (x 1000/ μ l)	20,08	8,93	2,82

Signifikante Korrelationen zwischen den Hb A₁-
Werten und den übrigen Gruppenmeßwerten ergaben
sich nicht :

	r	p
Hämoglobin	0,087	0,405
Nüchtern-BZ	0,423	0,122
Leukozyten	0,383	0,137

Tabelle 9 Einzeldaten der Gruppe C

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb g%	Hb A ₁ %	BZ mg%	Leuko- zyten	Befund - Diagnose Verdachtsdiagnose
1	Cocker	w	12	14,8	10,10	106	41600	Lebertumor
2	RHD	m	4	8,7 5,4	7,80 16,70	58 104	20400 23000	Lymphosarkom am Duodenum 2. Unters. nach 7täg. Behandlung (u.a. Infusionstherapie)
3	Pudel	m	12	14,8	6,56	83	18400	Lebertumoren
4	Labrador	w	9	14,7	8,35	76	12400	Milztumor, Lebermetastasen
5	Boxer	m	10	9,9	5,04	83	11400	Lebertumoren
6	Kl. Mstl.	w	1	16,6	5,62	68	25200	Leukose (Verdachtsdiagnose)
7	Boxer	w	9	15,5	9,02	78	12400	Lebertumor, Herzinsuffizienz
8	Boxer	w	7	13,4	6,70	86	19600	Leukose
9	Pudel	w	9	5,4 8,9	1,80 3,40	66 80	22400 8200	Milztumor (Hämangiom) 9 Tage post operationem
10	DD	w	4	12,3 10,6 12,2 13,7 12,0 10,1	9,36 7,95 7,32 8,42 8,81 8,20	78 75 78 76 82 80	12200 20400 29800 16800 28400 29000	Lungenverschattung, Leukose-Verdacht 2 Monate später, Beginn Leukeranbeh. 21 Tg. später 18 Tg. später, Abmagerung 2 Monate später 191 Tage nach 1. Untersuchung, Verschattung auch im Leberbereich Euthanasie

8.4. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit einer Anämie (Gruppe D)

In dieser Gruppe sind 10 Hunde aufgeführt, die das Krankheitsbild einer Anämie aufgrund unterschiedlicher Genese zeigten.

Bei 2 Hunden lag eine iatrogen bedingte Knochenmarksschädigung durch Östrogenüberdosierung vor. Die Anamnese dieser Patienten war nahezu identisch. Sie waren etwa 3 Wochen vor dem Auftreten der Krankheitssymptome (Polydipsie, Blutung aus der Vagina) mit Hormonen behandelt worden, nachdem eine unerwünschte Bedeckung stattgefunden hatte (Hd. Nr. 1 + 2). Bei Patient Nr. 2 erbrachte die mikroskopische Auswertung eines Sternalpunktats die Bestätigung der Verdachtsdiagnose.

Hund Nr. 6 und 7 wurden auch in Gruppe C aufgeführt, da bei ihnen die Anämie durch eine tumoröse Entartung des Retikulo-endothelialen Systems verursacht wurde.

Tabelle 10 gibt die Ergebnisse, Tabelle 11 die Einzeldaten wieder.

Signifikante Korrelationen konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 10 : Ergebnisse der Gruppe D (Anämie)
(n = 10)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	6,80	3,61	1,14
Hämoglobin (g%)	7,53	3,12	0,98
Hb A ₁ (%)	9,14	3,16	1,00
Nüchternblut- zucker (mg%)	92,60	25,58	8,08
Erythrozyten (x 10 ⁶ /µl)	2,58	0,86	0,27

Signifikante Korrelationen konnten nicht festgestellt werden (zu Hb A₁) :

	r	p
Hämoglobin	- 0,364	0,150
Nüchtern-BZ	0,246	0,247
Erythrozyten	0,066	0,428

Tabelle 11 : Einzeldaten und Meßergebnisse der Gruppe D (Anämie)
(n = 10)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Erythro- zyten (x 10 ⁶ /ul)	Befund - Diagnose - Genese
Bemessungsgrundlage :				10,5			3,9	
1	Pudel	w	11	10,4	11,90	97	3,4	Östrogenüberdosierung (vor 3 Wochen)
2	Mischling	w	10	4,0 3,0	10,30 14,40	92 105	3,7 1,6	Östrogenüberdosierung vor 3 Wochen 10 Tg. nach Ovariohysterektomie und Bluttransfusionen, moribund
3	Mischling	m	3	8,5	6,38	87	3,7	Penisverletzung, rezidiv. Blutung
4	DSH	w	11	12,2	6,90	123	2,14	Ovarialtumor
5	DSH	m	1	5,4	9,22	46	1,7	Cumarinvergiftung (vor 2 Wochen)
6	LDH	m	4	8,7 5,4	7,80 16,70	58 104	3,2 2,2	Lymphosarkom nach 7täg. Behandlung (Infusionen)
7	Pudel	w	9	5,4 8,9	1,80 3,40	66 80	1,89 2,53	Hämangiom der Milz 9 Tage post operationem
8	DD	w	5	10,2	9,02	89	3,3	Cumarinvergiftung (vor ca. 10 Tagen)
9	RHD	m	11	2,3	11,85	135	0,9	unbekannte Ursache und Dauer, moribund nach Blutentnahme Euthanasie
10	RHD	w	5	8,6	9,00	89	3,1	Cumarinvergiftung (vor ca. 1 Woche)

8.5. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit Erkrankungen der Leber (Gruppe E)

8 Hunde im Alter von 12 Wochen bis 14 Jahren sind in dieser Gruppe zusammengefaßt. Mit Ausnahme von Hd.Nr. 1 sind die erfaßten Patienten an chronischen Leberveränderungen erkrankt. Bemessungsgrundlagen dieser Gruppe sind neben anamnestischen, klinischen und röntgenologischen Befunden die Ergebnisse der Serumuntersuchung. Als Grenzwerte wurden eine Aktivität der GPT von mehr als 50 IU/l und/oder eine Aktivität der AP von mehr als 190 IU/l festgelegt.

Einen Überblick über die Ergebnisse und Einzelwerte geben die Tabellen 12 und 13.

Tabelle 12 : Ergebnisse der Gruppe E (Leber)
(n = 8)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	7,25	4,26	1,50
Hämoglobin (g%)	16,85	2,54	0,89
Hb A ₁ (%)	7,30	2,33	0,82
Nüchternblut- zucker (mg%)	92,12	58,75	20,77
GPT (U/l)	48,68	30,32	10,72
AP (U/l)	333,12	245,96	86,95

Korrelationen zu Hb A₁ :

	r	p
Hämoglobin	0,034	0,468
Nüchtern-BZ	0,154	0,358
GPT	0,091	0,415
AP	- 0,029	0,473

Signifikante Korrelationen konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 13 : Einzeldaten und Messergebnisse der Gruppe E (Leber)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	GPT (U/l)	AP (U/l)	Befund	Diagnose
Bemessungsgrundlage :										
							50	190		
1	Retriever	m	0,2	12,0	7,45	77	78	252	hochgrd. Ikterus, Hepatitis	
2	LHD	m	10	19,5 14,1	5,85 5,72	106 109	1,5 1,5	717 693	Rö. hochgrd. Leberschwellung 7 Tg. nach 1. Behandlung	
3	Basset	m	8	15,7	6,41	109	56	41	Rö. Leberschwellung	
4	Pudel	m	14	18,4	11,05	59	56	286	Rö. Leberschwellung	
5	Airedale	w	11	15,7	9,2	38	74	202	Ikterus (Rö. Lebervergrößerung)	
6	Yorkshire T	m	5	17,4	7,05	344	69	174	Rö. Lebervergr., bei Blutent- nahme hysterisch nach 14 Tg.;Beh. (Hepabionta)	
7	Collie	m	4	16,9 20,6	6,94 8,30	103	54	183	vorbek., Rö. Leberschwellung, Aszites, Rö. Leberschwellung	
8	Dalmatiner	w	5	18,4	3,28	48	48	284		

8.6. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit Verdacht auf Erkrankungen des exkretorischen Anteils der Bauchspeicheldrüse (Gruppe F)

In dieser Gruppe sind 6 Hunde im Alter von 1 bis 6 Jahren zusammengefaßt, die denen die Verdachtsdiagnose "Erkrankung des exkretorischen Pankreas" gestellt wurde.

Alle Hunde zeigten unter der Medikation mit Pankreas-enzymen (Pankreon^R) eine deutliche Besserung ihres Allgemeinzustandes. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Patienten mehr als 2 Wochen vorbehandelt. Die Ergebnisse und Einzeldaten sind in den Tabellen 14 und 15 aufgeführt. Signifikante Korrelationen zwischen den Hb A₁-Werten und den übrigen Gruppenmeßwerten sind nicht vorhanden.

Tabelle 14 : Ergebnisse der Gruppe F
(n = 6)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	3,50	2,25	0,92
Hämoglobin (g%)	17,61	3,26	0,49
Hb A ₁ (%)	6,07	1,21	0,49
Nüchternblut- zucker (mg%)	81,67	24,97	10,19
Serumlipase (IU/l)	24,33	23,41	9,55

Korrelationen zu Hb A₁:

	r	p
Hämoglobin	0,398	0,217
Nüchternblutzucker	- 0,006	0,495
Serumlipase	0,581	0,113

Tabelle 15 : Einzeldaten und Messergebnisse der Gruppe F
(n = 6)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ %	BZ (mg%)	Lipase (U/l)	Behandlung
1	DD	m	6	18,1	5,76	97	3	seit 7 Mon. Pankreonbehandlung
				18,0	6,23	116	20	Kontrollunters. nach 6 Monaten
2	DSH	m	3	20,9	6,38	87	10	seit 4 Mon. Pankreonbehandlung
3	DSH	m	1	17,8	6,00	50	51	seit 2 Mon. Pankreonbehandlung
4	DSH	w	4	20,1	8,01	67	57	seit 2 Mon. Pankreonbehandlung
5	DSH	w	1	11,6	5,82	112	2,4	Endoparasiten, seit 2 W. Pankreonb.
6	Dalmatiner	w	6	17,3	4,22	64	14	seit 3 Mon. Pankreonbehandlung

8.7. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit Erkrankungen der Nieren (Gruppe G)

In dieser Gruppe sind 15 Hunde zusammengefaßt, bei denen eine Nierenerkrankung diagnostiziert wurde. Die Patienten Nr. 4 und 9 waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits vorbehandelt. Zwischen Hb A₁ und den Hämoglobinwerten konnte eine signifikante Korrelation gefunden werden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16 und 17 angegeben.

Tabelle 16 : Ergebnisse der Gruppe G (Nieren)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	9,13	2,45	0,64
Hämoglobin (g%)	16,06	2,30	0,59
Hb A ₁ (%)	9,05	1,48	0,38
Nüchternblut- zucker (mg%)	91,13	17,25	4,45
Kreatinin (mg%)	2,79	2,11	0,54
Serumharnstoff (mg%)	117,00	63,65	16,43

Korrelationen zu Hb A₁ :

	r	p
Hämoglobin	- 0,417	0,041
Nüchtern-BZ	0,465	0,060
Kreatinin	- 0,357	0,096
Serumharnstoff	0,297	0,141

Tabelle 17 : Einzeldaten und Messergebnisse der Gruppe G (Nierenkranke Hunde)
(n = 15)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Kreatinin (mg%)	Harnstoff (mg%)	Befund - Diagnose (PD = Polydipsie)
Bemessungsgrundlage :									
						1,8	oder	80	
1	RHD	w	10	19,3	8,30	115	2,0	220	Gastritis, Urämie
2	LHD	w	10	13,0	10,57	93	0,7	180	Urämie, Cystenniere
3	DSH	m	9	15,8 15,0	6,70 7,50	73 81	1,9 2,2	80	Prostatavergrößerung, PD 1 Mon. später, Gastritis
4	Cocker	w	7	17,0	8,29	108	3,3	220	Urämie, Nephrose
5	Boxer	m	9	18,7	9,43	59	2,8	48	Polydipsie
6	Pinscher	w	15	19,3	5,44	57	5,8	28	ohne klin. Bef., guter AZ
7	Pudel	w	11	15,7	9,20	88	9,4	144	Urämie, Gastritis
8	RHD	w	6	12,3	10,60	98	1,61	220	Nephrose (Hypoplasie ?)
9	Welsh Terr.	m	10	16,4	9,67	92	2,7	83	Urämie, Gastritis
10	Cocker	m	5	15,9	8,24	106	2,0	90	Polydipsie
11	Shi tzu	w	7	15,6	8,84	78	2,5	86	Gastritis (neurogen?)
12	Boxer	♀	10	19,4	10,81	108	1,98	90	Polydipsie
13	Cocker	m	7	14,2	8,70	90	1,45	80	Polyurie
14	Pudel	w	11	13,9	9,80	94	1,57	88	Harninkontinenz, PD
15	DSH	m	10	14,8	10,70	104	2,2	98	Gastritis, Polydipsie

8.8. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit einer Pseudogravidität (Gruppe H)

Diese Gruppe umfaßt 6 Hunde im Alter von 1 bis 11 Jahren, bei denen aufgrund von Verhaltensänderungen und einer Lactatio falsa eine Pseudogravidität diagnostiziert wurde. Die vorangegangene Läufigkeit war bei allen Hunden normal verlaufen. Sie lag zwischen 4 und 6 Wochen zurück. Bei 4 Hunden war eine zum Teil hochgradige Lactatio falsa vorhanden. Die Befunde der klinischen Untersuchungen wiesen keine pathologischen Abweichungen auf. Die Tabellen 18 und 19 geben einen Überblick über die Meßdaten und Ergebnisse. Signifikante Korrelationen zwischen Hb A₁ und den hämatologischen Meßdaten ergaben sich nicht.

Tabelle 18 : Ergebnisse der Gruppe H
(pseudogravide Hunde)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	7,50	3,73	1,52
Hämoglobin (g%)	16,47	2,31	0,94
Hb A ₁ (%)	7,94	0,76	0,31
Nüchternblut- zucker (mg%)	94,50	25,99	10,61

Korrelationen zum Hb A₁-Wert :

	r	p
Hämoglobin	0,417	0,205
Nüchtern-BZ	0,127	0,405

Tabelle 19 : Einzeldaten und Meßergebnisse
der Gruppe H (pseudogravide Hunde)

Nr.	Rasse	Alter Jahre	Hb g%	Hb A ₁ %	BZ mg%	Befunde
1	LHD	1	18,8	8,81	66	Pseudogravidität
2	RHD	7	19,0	7,30	63	Lactatio falsa
3	LHD	10	14,0	7,39	95	Lactatio falsa
4	Pudel	10	13,6	7,20	115	Pseudogravidität
5	LHD	6	16,2	8,90	128	Lactatio falsa
6	LHD	10	17,0	8,00	114	Lactatio falsa
			17,5	8,10	86	", 6 Mon. später

8.9. Hämoglobin A₁ bei glucocorticoid-behandelten
Hunden (Gruppe I)

In dieser Gruppe sind 9 Hunde zusammengefaßt, die in einem Zeitraum von 10 bis 28 Tagen vor der Hb A₁-Bestimmung mit einer einmaligen Gabe von Glucocorticoiden vorbehandelt worden waren. Genaue Angaben über die Menge und den Zeitpunkt der Glucocorticoidgabe konnten nicht in allen Fällen erhoben werden. Die Indikationen der Glucocorticoidtherapie waren sehr unterschiedlich (Gastroenteropathie, Hauterkrankungen mit Pruritus, Verdacht auf Panostitis eosinophila, Arthrosen).

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20 und 21 aufgeführt.

Eine Signifikanz in der Korrelation zwischen Hämoglobingehalt und Hb A₁ kann dargestellt werden.

Tabelle 20 : Ergebnisse der Gruppe I
(glucocorticoid-vorbehandelte Hunde)
(n = 9)

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	4,33	2,83	0,94
Hämoglobin (g%)	17,02	3,01	1,00
Hb A ₁ (%)	8,43	1,81	0,60
Nüchternblut- zucker (mg%)	90,44	36,48	12,16

Korrelationen zu Hb A₁ :

	r	p
Hämoglobin	0,659	0,027
Nüchternblut- zucker	0,334	0,190

Tabelle 21 : Einzeldaten und Meßergebnisse der Gruppe I (glucocorticoidvorbeh. Hunde)
(n = 9)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%) ¹	BZ (mg%)	Glucocorticoidgabe vor.. (x Tagen) Präparat
1	LHD	m	4	19,0	8,27	95	10 Dexamethason
2	DSH	m	7	14,9	8,22	116	10 Dexamethason
3	Chow Chow	m	0,5	11,0	6,30	106	16 Dexamethason
4	Collie	m	4	19,6	8,3	75	12 Dexamethason
5	Yorkshire T w		6	18,2	8,67	67	28 Triamcinolon
6	Foxterrier	m	7	18,1	7,73	41	? Triamcinolon
7	Schnauzer	w	8	20,3	12,90	135	? Triamcinolon
8	Mischling	m	1	17,8	7,92	42	10 Dexamethason
9	Terrier	w	1	14,3	7,58	137	12 Dexamethason

8.10. Hämoglobin A₁ bei Hunden mit einer Herz- erkrankung (Gruppe K)

In dieser Gruppe sind 9 Hunde zusammengefaßt, bei denen eine Herzinsuffizienz diagnostiziert wurde. Beurteilungsgrundlage war, neben klinischen Symptomen, das Vorliegen eines Herzgeräusches in der Systole oder Diastole.

Alle untersuchten Hunde waren vorbehandelt.

Bei 7 Hunden wurde regelmäßig β -Methyldigoxin (Lanitop^R) in einer Dosierung von 0,01 mg/kg KGW verabreicht. Bei Patient Nr. 1 und 3 konnte nicht geklärt werden, mit welchem Präparat vorbehandelt worden war.

Der Beginn der Methyldigoxintherapie lag bei der Bestimmung des Hb A₁-Wertes zwischen 2 Wochen und 4 Jahren zurück.

Die Einzelwerte und Ergebnisse sind in den Tabellen 22 und 23 aufgeführt.

Tabelle 22 : Ergebnisse der Gruppe K

	$\bar{x}$	SD	SE
Alter (Jahre)	10,50	4,30	1,37
Hämoglobin (g%)	16,45	1,82	0,61
Hb A ₁ (%)	11,47	4,37	1,46
Nüchternblutzucker (mg%)	85,22	19,28	6,43

Korrelation zum Hb A₁-Wert :

	r	p
Hämoglobin	- 0,399	0,143
Nüchternblutzucker	- 0,589	0,047

Zwischen den Hb A₁-Werten und den Blutzuckerwerten ergab sich eine negative Korrelation.

Tabelle 23 : Einzeldaten und Messergebnisse der Gruppe K
(n = 9)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Behandlungsdauer
1	Welsh T.	m	12	18,4	13,44	92	ca. 1 Jahr, unbekanntes Präparat
2	Basset	w	12	14,0	13,26	90	3 Monate
3	Dogge	m	5	14,6	8,55	78	vorbeh. u. a. mit Effortil
4	Pudel	w	14	16,1	17,65	72	3 Jahre
5	LHD	m	9	19,4	5,72	94	4 Jahre
6	LHD	m	9	15,7	8,74	69	3 Jahre
7	Spitz	m	16	15,1	18,13	52	4 Wochen
8	Pudel	m	13	17,9	9,48	108	6 Monate
9	Irish Wolf.m		5	16,9	8,27	112	2 Wochen

8. 11. Hämoglobin A₁ bei diabetischen Hunden (Gruppe L)

In dieser Gruppe sind 19 Hunde zusammengefaßt, bei denen ein Diabetes mellitus festgestellt wurde. Bemessungsgrundlage dieser Gruppe war ein Nüchternblutzuckerspiegel von mehr als 140 mg/100 ml. Bei 10 Hunden konnten Verlaufskontrollen der Diabetestherapie gemacht werden. Die Behandlung der Diabetiker erfolgte ausschließlich mit täglichen (1 x) subkutanen Injektionen von Long-Insulin^R, die vom Besitzer durchgeführt wurden (mit Ausnahme von Hund Nr. 13, der tägl. in der Praxis die Injektionen erhielt).

Die Einzelwerte und Ergebnisse sind in Tabelle 24 und 25 aufgeführt.

Tabelle 24 : Ergebnisse der Gruppe L
(diabetische Hunde) (n = 19)

	$\bar{x}$	SD	SE
1. alle Einzelwerte (n = 63)			
Hämoglobin (g%)	14,37	2,76	0,37
Hb A ₁ (%)	13,45	5,20	0,65
Nüchternblut- zucker (mg%)	226,13	114,25	14,39
2. gemittelte Einzelwerte (mehrere Einzelwerte der Verlaufskontrolle eines Hundes werden gemittelt) (n = 19)			
Alter (Jahre)	8,95	2,75	0,63
Hämoglobin (g%)	14,72	2,32	0,53
Hb A ₁ (%)	13,08	4,02	0,92
Nüchternblut- zucker (mg%)	233,00	84,74	19,44

Signifikante Korrelationen zwischen den Hb A₁-Werten und den Hämoglobin- bzw. Blutzuckerwerten ergaben sich nicht :

	r	p
1. alle Einzelwerte		
Hämoglobin	0,167	0,113
Nüchtern-BZ	0,042	0,373
2. gemittelte Einzelwerte		
Hämoglobin	0,236	0,166
Nüchtern-BZ	- 0,346	0,074

Tabelle 25 : Einzelwerte und Messergebnisse der Gruppe L (Diabetische Hunde)

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Tage nach Erstuntersuchung	Befunde - Diagnosen- Behandlung - lung (PD = Polydipsie)
Bemessungsgrundlage :							140 bei der Erstuntersuchung	
1	LHD	w	10	15,6	12,89	153		Nephrose, PD, Urämie
2	Boxer	w	2	17,5	9,45	145		PD, Nephritis
3	Mischling	w	12	15,1	10,70	222		seit 6 Mon. mit 10 iE Insulin behandelt, guter AZ
4	Pudel	m	9	13,4	9,80	292		PD, Lebervergrößerung, Nephrose ¹
5	Pinscher	w	8	15,7	20,90	222		PD, Herzinsuff. (Methyldigoxin) ⁰
6	Pudel	w	10	17,8	19,80	242		PD, Pankreastumor(?)
7	Yorkshire T	w	7	14,2	9,10	315		PD, vor 1 Mon. läufig
8	DL	w	9	11,2	9,20	517		PD, vor 1 Mon Hormonbehandlung zur Läufigkeitsverschiebung
9	Yorkshire T	m	5	16,6	8,93	255		PD, mit Triamcinolon vorbeh.
10	Setter	w	9	15,6	15,60	380		PD seit 6 Wochen, unregelm. Läufigkeiten
					14,60	312	14	bekam tgl. 14 iE Insulin
					10,80	176	51	keine PD, guter AZ
					13,67	289		
			$\bar{x} =$					
11	Cocker	w	9	15,8	17,30	144		PD, Ataxie, Harninkontinenz
					18,50	190	8	blieb ohne Insulinbeh., Euthan.
					17,90	167		
			$\bar{x} =$					

Fortsetzung Tabelle 25 :

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%) ¹	BZ (mg%)	Tage nach Erst- untersuchung	Befunde - Diagnosen - Behand- lung (PD = Polydipsie)
12	Mischling	m	10	13,7 12,8	15,6 11,9	235 118	12	Polyurie, Kryptorchide tgl. 15 iE Insulin, deutl. Bes- serung
			$\bar{x}$ =	13,25	13,75	176		
13	LHD	w	4	15,5	10,40	270	7	PD, Rö. Leberschwellung, vor 4 W.. tgl. 18 i.E. häufig
				16,0	9,80	89	12	keine weit. Beh.
				16,8	7,45	75	19	guter Allgemeinzustand
				15,5	18,40	641	111	guter Allgemeinzustand
				15,9	10,80	193	215	PD, war häufig, Lact. falsa
				15,9	11,37	144	221	tgl. 16 iE, keine PD mehr
				15,9	11,37	182	236	tgl. 16 iE, guter Allgemeinzust.
14	Welsh Terr.	w	11	10,8 11,5 11,3 10,2 10,5 11,2 13,8	10,20 16,20 17,90 19,20 17,20 20,60 12,50	320 250 87 290 178 243 174	26 39 60 80 99 128 149	PD, vor 6 W häufig, Linsentrüb. tgl. 14 iE, unregelmäßig PD keine PD, tgl. 10 iE keine PD tgl. 14 iE PD, tgl. 14 iE, Conj. cat. PD, tgl. 18 iE weiterhin PD, tgl. 20 iE Ataxie, blind, Euthanasie
			$\bar{x}$ =	11,3	18,55	225		
15	Pudel	w	10	15,2 14,5 14,7	24,50 12,00 17,30	273 150 242	8 28 35	PD, unregelmäßig häufig tgl. 10 iE, Herzinsuff. (Lanitop) keine PD, Urin neg, 5 iE tgl.
				15,6	10,00	57	62	tgl. 5 iE, guter Allgemeinzustand
				14,9	9,90	215	110	guter Allgemeinzustand, ohne Insul
				14,5	10,20	182	132	ggr. Ausfluß, häufig ??, 5 iE
				13,9	12,50	213	170	" " , weiter 5 iE, keine PD PD, Stauungsbronchitis

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ¹ (%)	BZ (mg%)	Tage nach Erst- untersuchung	Befunde - Diagnosen- Behandlung (PD = Polydipsie)
16	Pudel	w	13	12,2		75		Linsentrübung, vor 4 W häufig Harrinkontinenz, PD, 5 iE Hornhautulcus, 5 iE keine PD, Polyphagie guter Allgemeinzust., 5 iE " " 5 iE " , ohne Insulingabe läufig, beginnende PD 7 iE keine PD 5 Monate später ZNS-Störungen, Eutha.
17	RHD	w	10	12,4	15,50	157		PD, Exsikkose, Lact. falsa 18 iE keine PD, 15 iE keine PD 5 iE wieder PD, Polyurie, 10 iE keine PD, 5 iE, guter AZ Diarrhoe, keine PD PD, vor 4 W häufig, 12 iE Ovariohysterektomie, 8 iE guter AZ, sehr aufgeregt! 5 iE
18	LHD	m	11	11,0	9,60	213		PD, Diarrhoe, RÖ. Leberschwellung keine PD, 10 iE 10 iE 10 iE 10 iE 10 iE hatte hypoglykäm. Anfall, 8 iE wieder PD, 12 iE PD, Urin neg. verstirbt 2 W später an hämorrh. Enteritis

Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hb (g%)	Hb A ₁ (%)	BZ (mg%)	Tage nach Erstun- tersuchung	Befunde Behandlung (PD = Polydipsie)	Diagnosen
19	Pudel	w	11	13,2	7,16	354	4	Linsentrübung, PD, unregelm. häufig Ovariohysterektomie PD, 15 iE tgl. keine PD, 10 iE guter Allgemeinzustand, 10 iE wieder PD, 12 iE PD, Urinkontr. neg. guter Allgemeinzustand, 12 iE wieder PD, 18 iE	
				13,4	8,24	284	14		
				12,9	7,80	331	21		
						82	29		
				13,0	8,75	69	82		
				13,1	8,90	365	89		
				13,2	7,20	343	119		
					7,75	193	168		
				13,1	7,97	353			
						264			
				$\bar{x}$	=				

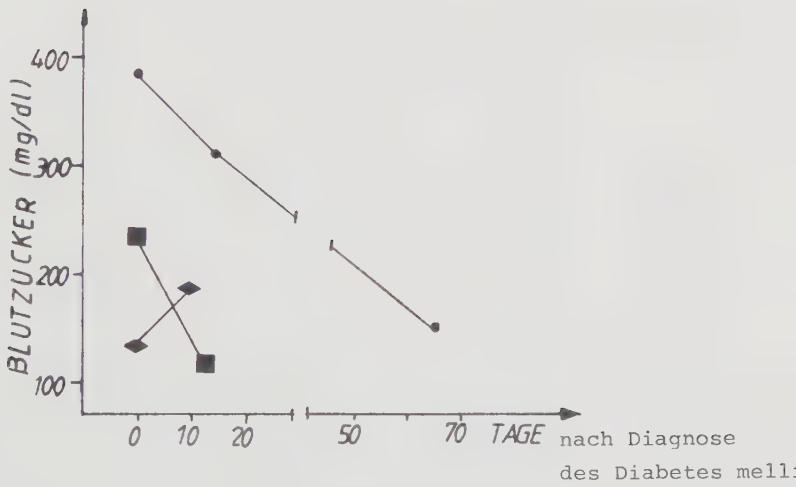
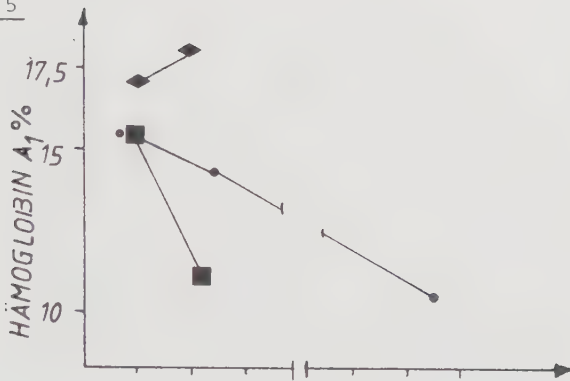
8.11.1 Verlaufsuntersuchungen bei diabetischen Hunden

Bei 10 in dieser Gruppe aufgeführten Hunden wurden Verlaufsuntersuchungen durchgeführt, um eine Therapiekontrolle unter Praxisbedingungen zu ermöglichen. Abb. 5 zeigt den Verlauf der Nüchternblutzuckerspiegel und der Hb A₁-Konzentration bei drei Patienten nach Diagnose des Diabetes mellitus und dem Therapiebeginn. Der Besitzer von Hund Nr. 11 war nicht zu einer Therapie bereit, da der Hund charakterlich schwierig war. Die Polydipsie blieb bestehen. Im weiteren Verlauf zeigte der Patient Inappetenz und zentralnervöse Ausfallserscheinungen. Im Anschluß an die 2. Blutentnahme wurde der Patient eingeschläfert.

Bei den Patienten 10 und 12 sinken sowohl der Blutzuckergehalt als auch der Hämoglobin A₁-Wert im Verlauf der Therapie. Beide Patienten konnten nicht weiter verfolgt werden.

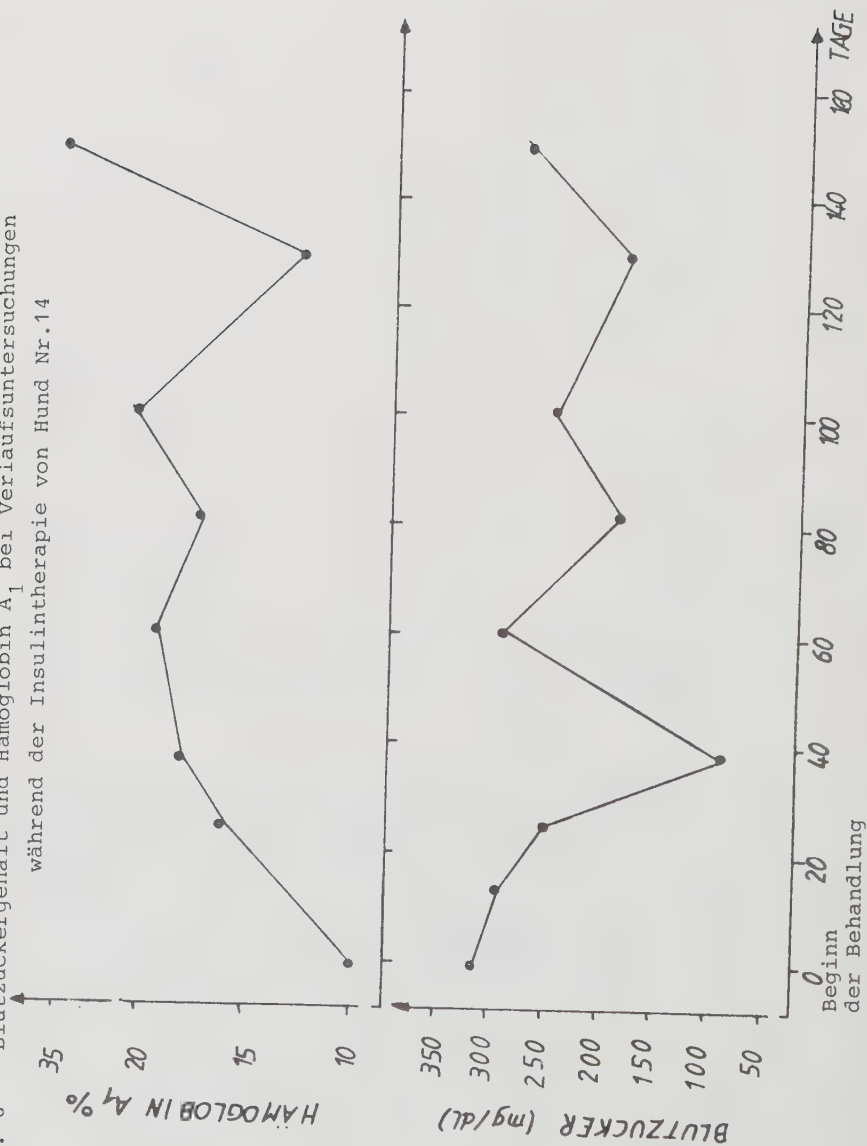
Hund Nr. 14 war nicht auf eine konstante Insulindosis bzw. auf einen konstanten Blutzuckerwert einzustellen. Er zeigte über den gesamten Behandlungszeitraum von 160 Tagen eine sehr labile Stoffwechsellage mit ständig schwankendem Ausmaß der Polydipsie. Sowohl Blutzuckerspiegel als auch Hb A₁-Werte schwanken sehr stark (siehe Abb.6).

Abb. 5



- = Hund Nr. 10
- ◆ = Hund Nr. 11
- = Hund Nr. 12

Abb. 6 Blutzuckergehalt und Hämoglobin A_1 bei Verlaufsuntersuchungen
während der Insulintherapie von Hund Nr. 14



In Abbildung 7 sind die Einzelwerte von zwei weiblichen Pudeln graphisch dargestellt. Beide hatten unregelmäßige Läufigkeitsintervalle. Sie bildeten häufig im Anschluß an die Läufigkeiten eine Pseudogravidität mit einer Lactatio falsa aus.

Die Polydipsie trat 4 bzw. 6 Wochen nach der letzten Läufigkeit auf.

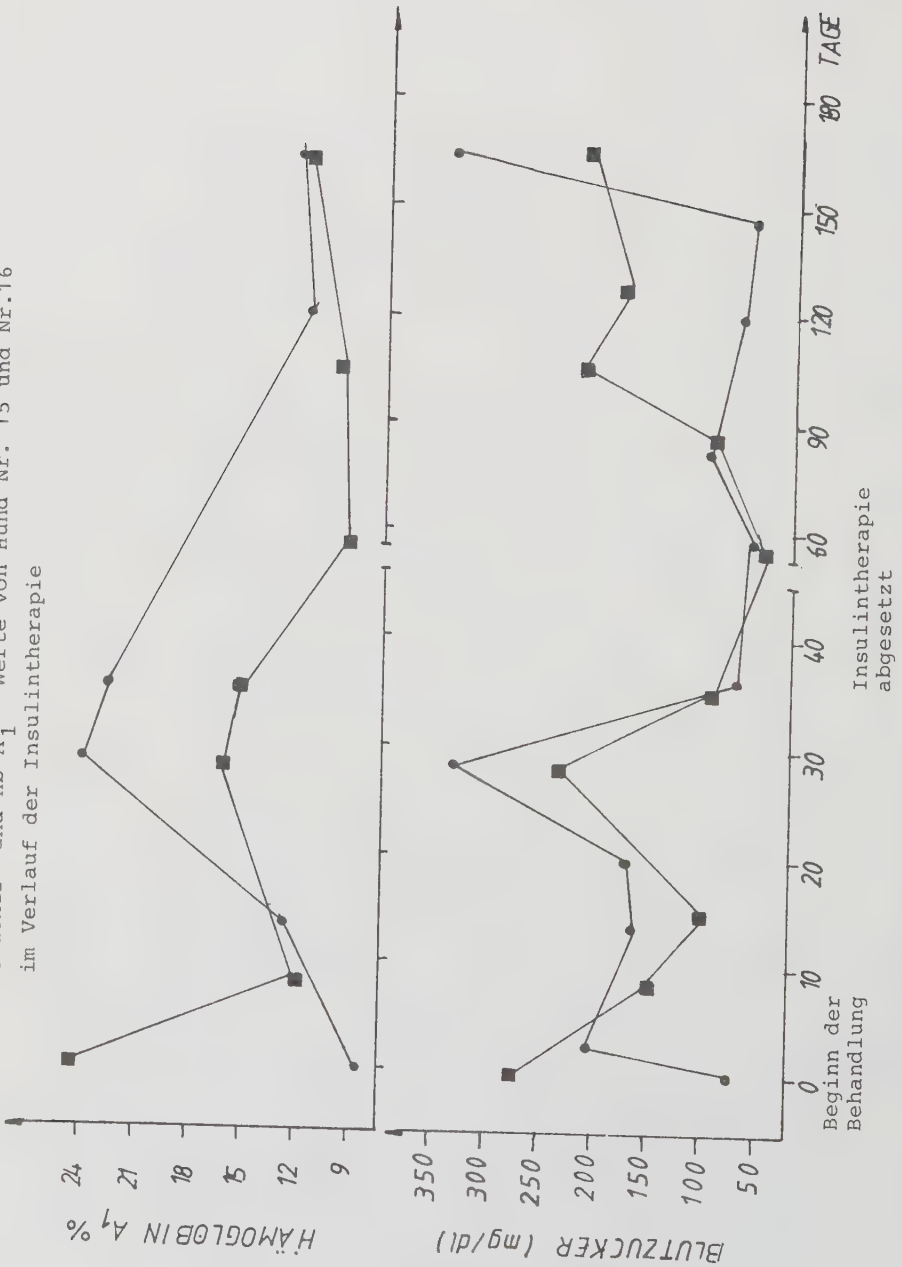
Bei Hund Nr. 16 wurde die erste Blutzuckerbestimmung vor Beginn der Polydipsie anläßlich einer vom Besitzer gewünschten Gesundheitsüberprüfung vorgenommen. Die Polydipsie trat zwei Tage später auf. Nach zweimonatiger Insulinbehandlung lagen die Blutzuckerwerte wieder im Normalbereich. Die Insulinbehandlung wurde abgesetzt. Eine Polydipsie bestand nicht mehr. Kontrolluntersuchungen in monatlichen Abständen ergaben Blutzuckerspiegel innerhalb der physiologischen Norm. Der Hämoglobin A₁-Anteil am Gesamthämoglobin blieb auf einem unveränderten Niveau.

Im Anschluß an die nächste Läufigkeit trat erneut eine hochgradige Polydipsie auf. Der Hund wurde auf Wunsch des Besitzers eingeschläfert.

Hund Nr. 15 reagierte mit einem deutlichen Abfall der Blutzuckerwerte wie auch der Hb A₁-Werte nach Beginn der Insulintherapie. Nach 35 Tagen wurde die Insulintherapie unterbrochen, da der Patient zweimal Symptome einer Hypoglykämie gezeigt hatte. Mit dem Auftreten von sehr schwach ausgeprägten Läufigkeitssymptomen war ein deutlicher Anstieg des Blutzuckerspiegels verbunden, ohne daß gleichzeitig eine Erhöhung des Hb A₁-Wertes vorlag. Diese Erhöhung trat erst nach längerem Bestehen der Hyperglykämie auf.

Zusätzlich wurde dieser Patient mit Methyldigoxin behandelt, da ein deutliches Herzgeräusch vorhanden war. Es entwickelte sich eine Stauungsbronchitis, die sich als therapieresistent erwies. Der Hund wurde daraufhin eingeschläfert.

Abb. 7 Blutzucker- und Hb A₁ - Werte von Hund Nr. 15 und Nr. 16
im Verlauf der Insulintherapie



■ = Hund Nr. 15
● = Hund Nr. 16

Hund Nr. 18 hatte bei der ersten Untersuchung einen sehr hohen Anteil an glykosyliertem Hämoglobin. Die Polydipsie verschwand bei Therapie mit Insulininjektionen trotz relativ hoher Blutglucosewerte. Der Anteil des Hb A₁ sank ab, blieb jedoch während der Verlaufsuntersuchungen auf einem relativ hohen Niveau von 14 %. Dem Hund konnte ohne Anwendung von Zwangsmaßnahmen kein Blut entnommen werden.

Den Verlauf der Hb A₁- und der Blutglucosewerte zeigt Abb. 8.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen von Hund Nr. 17 dargestellt. Der Patient war ein 11-jähriger weiblicher Rauhaardackel, der 4 Wochen nach der letzten Läufigkeit mit hochgradiger Exsikkose und Polydipsie vorgestellt wurde. Unter der Insulinbehandlung sanken Blutglucose- und Hb A₁-Wert ab. Die Dosierung der täglichen Injektionen wurde beibehalten. Es traten mehrfach "Anfälle" auf. Eine Polydipsie bestand weiterhin. Der niedrige Blutzucker-gehalt weist auf eine Hypoglykämie hin. Der Hb A₁-Anteil ist jedoch sehr hoch.

Die tägliche Insulingabe wurde reduziert, das Allgemeinbefinden besserte sich. Die Polydipsie verschwand. 4 Wochen nach der nächsten Läufigkeit stellte sich erneut Polydipsie und Polyurie ein. Der Hund wurde ovariohysterektomiert. Die Insulingaben wurden weiter reduziert.

Bei einer Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten war das Allgemeinbefinden des Patienten sehr gut. Eine Polydipsie bestand nicht. Es wurde ein relativ hoher Blutglucosespiegel gemessen. Anzumerken ist, daß der Hund immer sehr ängstlich war und vor dieser letzten Blutentnahme - im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen - lange im Wartezimmer und auf dem Untersuchungstisch verbracht hatte.

Abb. 8

Verlauf der Blutglucose- und Hämoglobin A₁-Werte von Hund Nr. 18

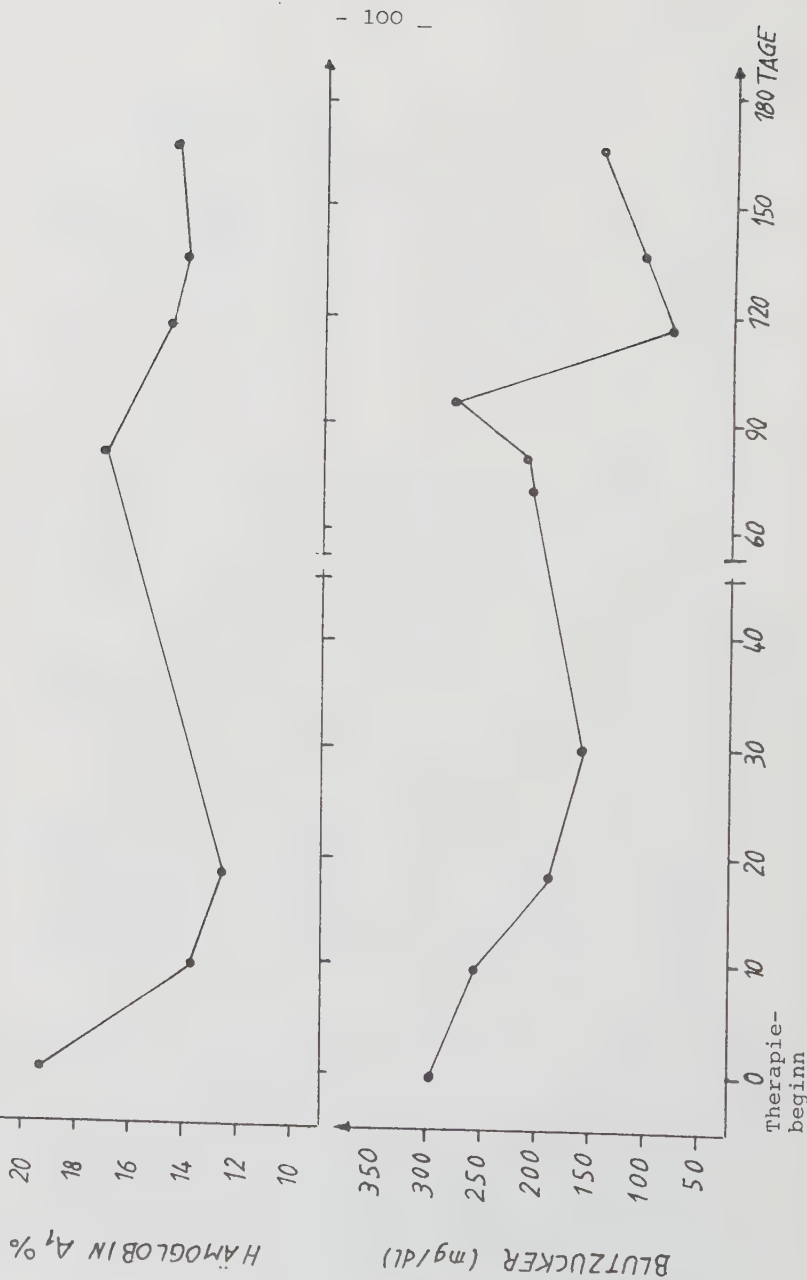
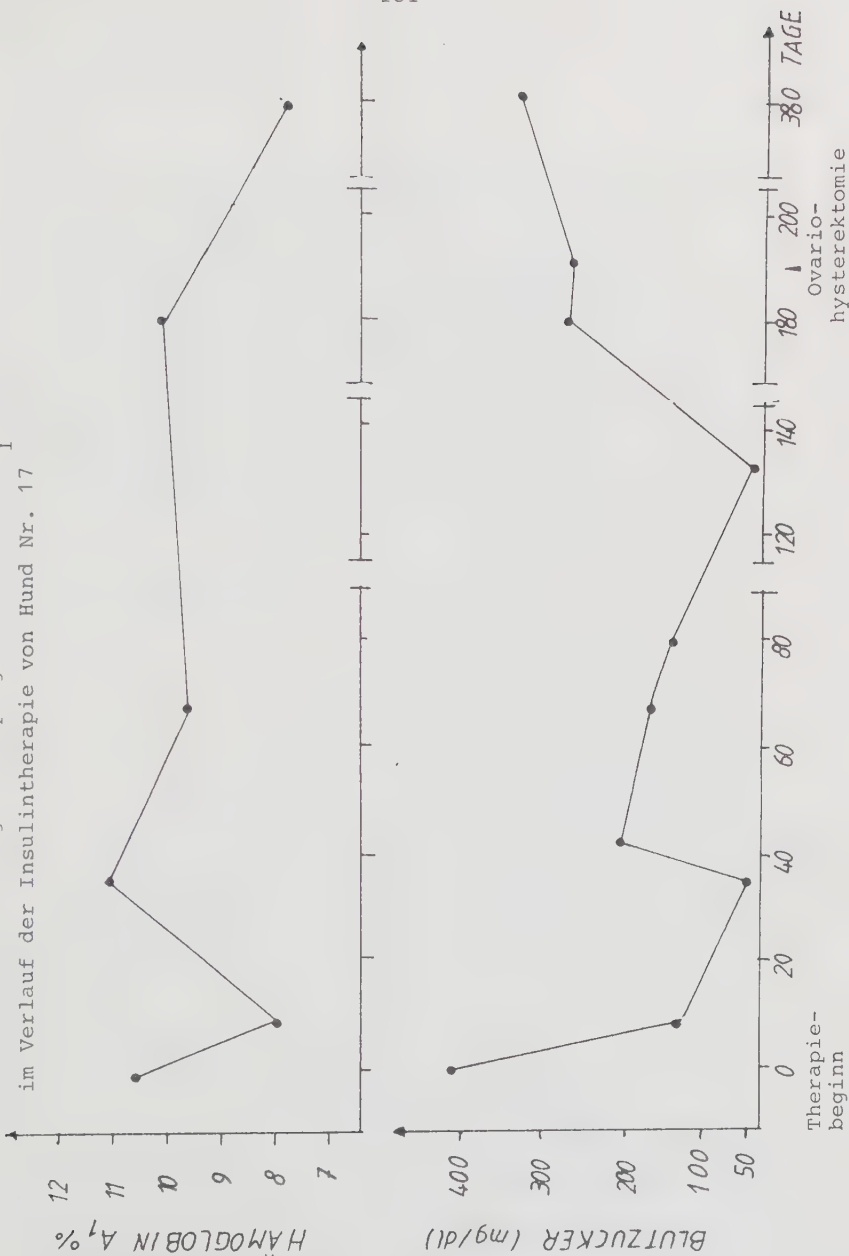


Abb. 9 Einzelwerte des Blutglucosespiegels und des Hb A₁ - Wertes im Verlauf der Insulintherapie von Hund Nr. 17



8.12. Vergleich der Meßwerte einzelner Gruppen

Die einzelnen Meßwerte der Gruppen wurden mittels einer Varianzanalyse miteinander verglichen. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des T-Tests auf ihre Signifikanz hin überprüft. In Tabelle 26 sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen zum besseren Überblick zusammengefaßt.

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Blutzuckerwerte ist zwischen der Gruppe L (Diabetiker) und allen anderen Gruppen feststellbar.

Für die Hb A₁-Werte ergaben sich signifikante Unterschiede gegenüber der Gruppe A (gesunde Hunde) in den Gruppen B,D,G,H,I,K und L.

Gegenüber der Gruppe B waren die Hb A₁-Werte der Gruppen A,F und L signifikant verändert.

Gegenüber der Gruppe C waren signifikante Unterschiede lediglich zur Gruppe L feststellbar.

Die Hb A₁-Werte der Gruppe D wiesen gegenüber den Gruppen A, F und L signifikante Unterschiede auf.

Für Gruppe E ergaben sich gegenüber den Gruppen K und L, für Gruppe F gegenüber den Gruppen B,D,G,I, K und L und für Gruppe H gegenüber den Gruppen A und L signifikante Unterschiede.

Gruppe I wies gegenüber den Gruppen A, F und L, Gruppe K gegenüber den Gruppen A, E und F signifikant unterschiedliche Hb A₁-Werte auf.

Gruppe L zeigte lediglich der Gruppe K gegenüber keinen signifikanten Unterschied der Hb A₁-Werte.

Einen Überblick über diese Signifikanzen gibt Abb. 10. Die Unterschiede sind darin in "nicht signifikant", "signifikant" ($p \leq 0,05$) und "hochsignifikant" ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

In Abb. 11 sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von ihrem Altersmittelwert angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden statt der Standardabweichungen die Standardfehler in der Darstellung gewählt, um die Variationsbreite wiederzugeben.

Zusätzlich wurde die Gruppe A (gesunde Hunde) in Jahrgangsklassen aufgeteilt. Die Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Jahrgänge sind in die Graphik aufgenommen, da diesbezüglich Unterschiede festgestellt wurden (vgl. 8.12.1.).

Tabelle 26 Zusammenfassung der Gruppenmittelwerte

Gruppe	Alter (Jahre)		Hämoglobin (g%)		Hämoglobin A ₁ (%)		Nüchternblutzucker (mg%)		Anzahl der Patienten n
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
A	4,57	3,47	16,85	1,75	6,28	0,98	85,29	22,17	58
B	7,26	4,73	15,73	3,36	8,63	2,25	88,86	20,09	15
C	7,90	3,53	12,57	3,46	7,46	2,75	81,25	10,18	10
D	6,80	3,61	7,53	3,12	9,14	3,16	92,60	25,58	10
E	7,25	4,26	16,85	2,54	7,30	2,33	92,12	58,75	8
F	3,50	2,25	17,61	3,26	6,07	1,21	81,67	24,97	6
G	9,13	2,45	16,06	2,30	9,05	1,48	91,13	17,25	15
H	7,50	3,73	16,47	2,31	7,94	0,76	94,50	25,99	6
I	4,33	2,83	17,02	3,01	8,43	1,81	90,44	38,48	9
K	10,50	4,30	16,45	1,82	11,47	4,37	85,22	19,28	9
L ₁	8,95	2,75	14,37	2,76	13,45	5,20	226,13	114,25	19
L ₂	8,95	2,75	14,72	2,32	13,08	4,02	233,00	84,74	19

- 104 -

L₁ - Ergebnisse der Einzelwerte

L₂ - Ergebnisse der Mittelwerte der einzelnen Patienten

Abb. 10 Signifikanzen der Gruppenmittelwerte im T-Test

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L
A		■	•	▲	•	•	■	■	■	■	■
B	■		•	•	•	■	•	•	•	•	■
C	•	•		•	•	•	•	•	•	•	■
D	▲	•	•		•	▲	•	•	•	•	▲
E	•	•	•	•		•	•	•	•	▲	■
F	•	■	•	▲	•		■	•	■	■	■
G	■	•	•	•	•	■		•	•	•	■
H	■	•	•	•	•	•	•		•	•	■
I	■	•	•	•	•	■	•	•		•	■
K	■	•	•	•	▲	■	•	•	•		•
L	■	■	■	▲	■	■	■	■	■	•	

Hämoglobin A₁

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L
A		•	•	•	•	•	•	•	•	•	■
B	•		•	•	•	•	•	•	•	•	■
C	•	•		•	•	•	•	•	•	•	■
D	•	•	•		•	•	•	•	•	•	■
E	•	•	•	•		•	•	•	•	•	■
F	•	•	•	•	•		•	•	•	•	■
G	•	•	•	•	•	•		•	•	•	■
H	•	•	•	•	•	•	•		•	•	■
I	•	•	•	•	•	•	•	•		•	■
K	•	•	•	•	•	•	•	•	•		■
L	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

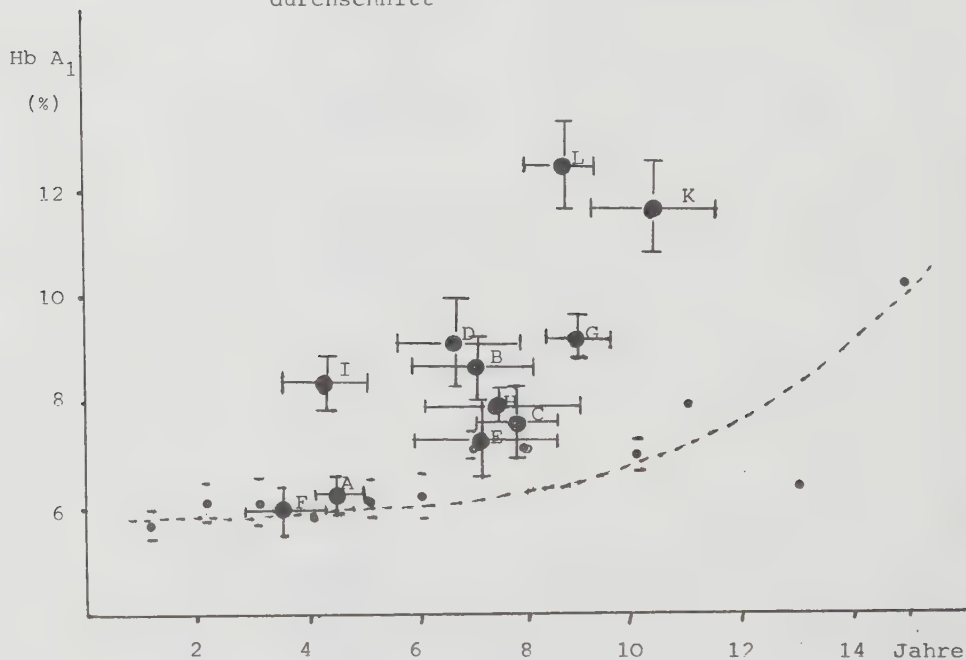
Blutzucker

• = nicht signifikant

▲ = signifikant

■ = hoch signifikant

Abb. 11 Graphische Darstellung der Hb A₁-Gruppenmittelwerte in Abhängigkeit vom Altersdurchschnitt



● = Gruppenmittelwerte mit Standardfehler

• = Altersgruppenmittelwerte der Gruppe A (gesunde Hunde)

Mit Ausnahme der Gruppen C, E und F liegen alle Patientengruppen im Hb A₁-Gehalt erheblich über den gestaffelten Altersgruppen der Gruppe A, wobei sich die Gruppen L und K deutlich von den übrigen Gruppen absetzen.

8.12.1. Vergleich der Altersgruppen

Innerhalb der Gruppe A (gesunde Hunde) wurde eine Aufteilung nach Jahrgängen vorgenommen.

Da es keine objektiven Parameter zur Unterscheidung "junger Hund" und "alter Hund" gibt, wurden die Hunde in Jahrgangsklassen aufgeteilt und ihre Mittelwerte gemittelt. Dabei konnte festgestellt werden, daß sowohl der Hb A₁-Wert als auch der Blutzuckergehalt mit zunehmendem Lebensalter anstiegen.

Um signifikante Unterschiede zu erkennen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Dazu wurde die Gruppe A jeweils in zwei Altersgruppen aufgeteilt und ihre Mittelwerte miteinander verglichen. Die Gruppe "n Jahre und jünger" wurde der Gruppe "(n+1) Jahre und älter" gegenübergestellt.

Der größte, hochsignifikante Unterschied der Hb A₁-Werte ergab sich zwischen den Altersgruppen 1 - 6 Jahre und 7 Jahre und älter ($p = 0,000$). Die Blutzuckerwerte zeigen bei den 8jährigen und älteren Hunden signifikante Unterschiede gegenüber den Werten der jüngeren Hunde.

Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 27 aufgeführt. In Abb. 12 und 13 sind die Ergebnisse der Mittelwertberechnung der einzelnen Jahrgänge graphisch dargestellt.

Tab. 27

Vergleich der Altersgruppen in Gruppe A (gesunde Hunde)

(n = 58)

Alter (Jahre)	Anzahl	Hämoglobin A ₁		p	Blutzucker		p
		$\bar{x}$ (%)	SD (%)		$\bar{x}$ (mg%)	SD (mg%)	
1	15	5,81	0,74		78,26	22,18	
2	43	6,48	1,02	0,010	87,69	22,27	0,169
3	24	5,95	0,76		81,37	21,15	
4	34	6,55	1,07	0,016	88,00	23,23	0,265
5	26	5,97	0,75		81,65	21,00	
6	32	6,57	1,09	0,016	88,18	23,47	0,269
7	33	5,91	0,73		82,42	23,09	
8	25	6,82	1,07	0,001	89,00	21,44	0,268
9	36	5,93	0,73		83,91	22,84	
10	22	6,92	1,07	0,001	87,45	22,13	0,562
11	40	5,96	0,79		83,02	22,25	
12	18	7,08	0,96	0,000	90,22	22,71	0,270
13	48	6,13	0,86		82,04	22,08	
14	10	7,15	1,17	0,024	100,70	17,98	0,012
15	51	6,18	0,88		82,60	21,64	
16	7	7,23	1,32	0,080	104,57	19,73	0,026

Abb. 12 Altersgruppenmittelwerte Hb A₁
(Gruppe A - Gesunde Hunde)

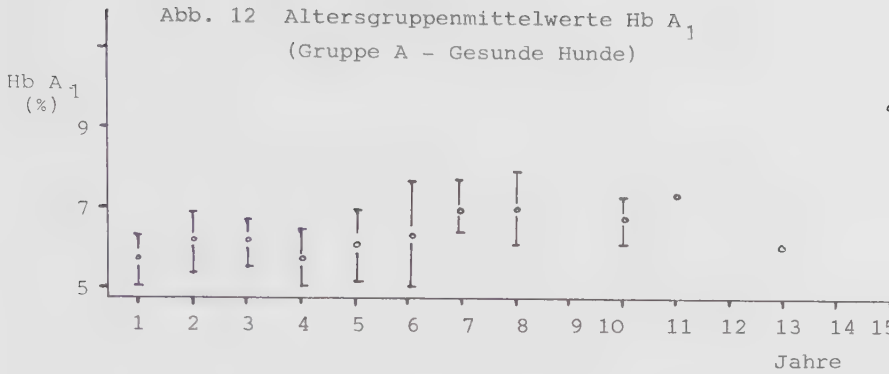
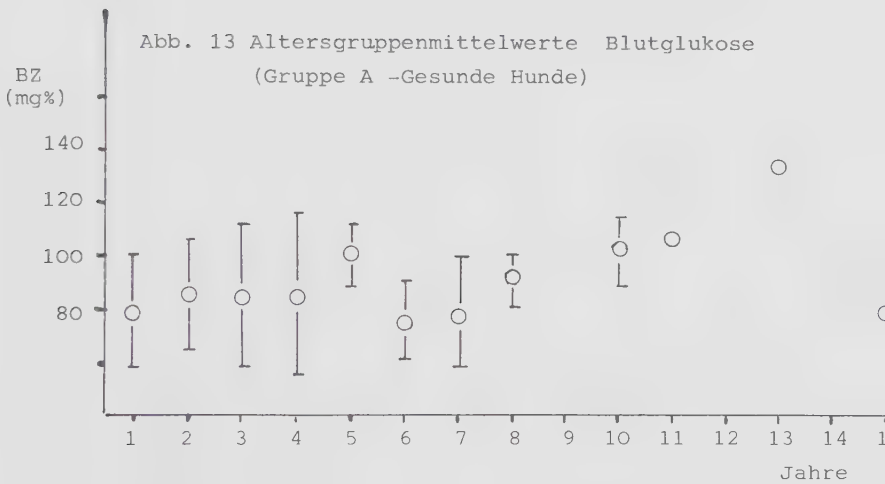


Abb. 13 Altersgruppenmittelwerte Blutglukose
(Gruppe A - Gesunde Hunde)

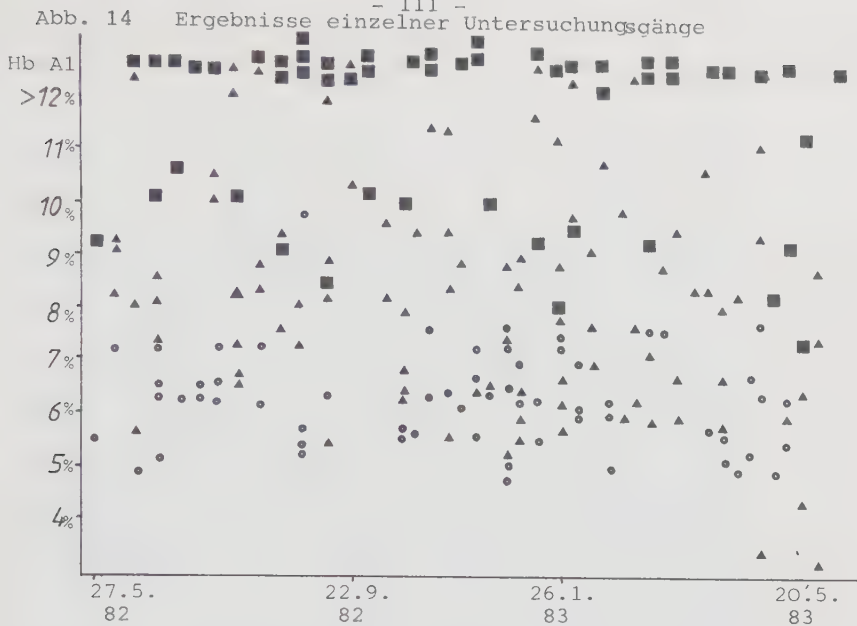


8.13 Ergebnis der Qualitätskontrollen

Die Meßergebnisse einzelner Bestimmungsabläufe wurden protokolliert, um jahreszeitliche und routinebedingte Einflüsse zu erkennen. Die ersten vier Untersuchungsgänge wurden zur Einführung unter Anleitung einer medizinisch-technischen Assistentin, die in der Hb A₁-Bestimmung erfahren war, durchgeführt.

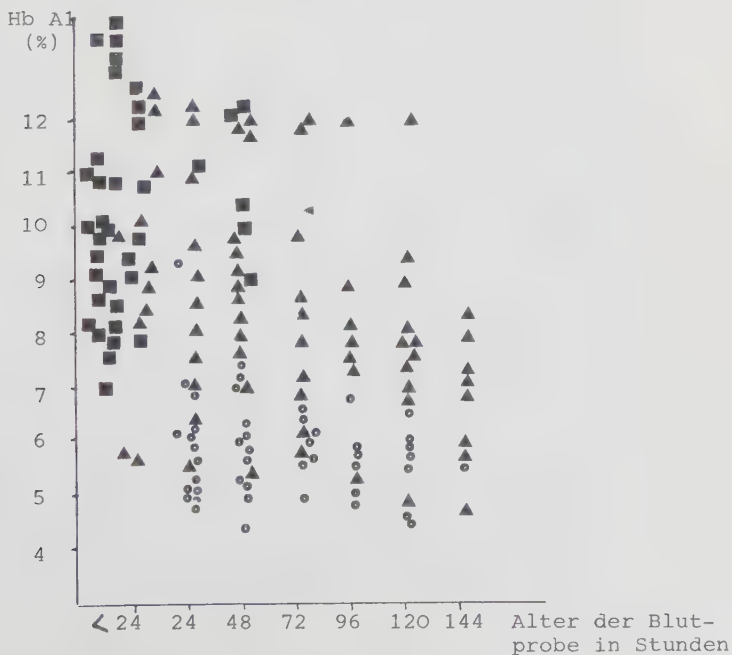
Die Ergebnisse sind in Abb. 14 graphisch dargestellt.

Abb. 15 gibt die Einzelwerte in Abhängigkeit von der Lagerdauer wieder. Auch nach einer Lagerung von 5 Tagen bei 4 - 8 °C sind dabei keine deutlichen Einflüsse auf die Hb A₁-Werte zu erkennen.



- = gesunde Hunde (Gruppe A)
- ▲ = kranke Hunde (Gruppen B - K)
- = diabetische Hunde (Gruppe L)

Abb. 15 Meßergebnisse in Beziehung zur Lagerdauer



9. DISKUSSION

Hämoglobin A₁ stellt eine postsynthetische Modifikation des Hämoglobin A dar. Das Hämoglobin A wird dabei an den aminoterminalen Enden der β -Ketten nichtenzymatisch glykosyliert. Der Reaktionspartner Glukose verbindet sich mit dem Hämoglobin zu einer instabilen Schiff'schen Base (Aldiminform). Dieser Vorgang ist reversibel. Erst die Amadori-Umlagerung führt zur Bildung einer stabilen Bindung (Ketoaminform). Das Ausmaß der Hämoglobin A₁-Bildung ist von der Höhe des jeweiligen Blutglukosespiegels abhängig. Hämoglobin A₁ spiegelt in seinem Verhältnis zum Gesamthämoglobin die durchschnittliche Blutglukosekonzentration über einen großen Zeitraum wider, was bei der Diabetesdiagnose und der Therapiekontrolle von Diabetikern in der Humanmedizin praktisch genutzt wird.

Das Hämoglobin des Hundes besitzt die physiologischen Voraussetzungen für die Glykosylierung, da die Erythrozytenmembran für Glukose permeabel ist (103) und die N-terminalen Aminogruppen nicht blockiert sind (26,60,61,108,189). Eine die Glykosylierung begünstigende 2,3-DPG-Bindungsstelle ist außerdem vorhanden (30).

Das Hämoglobin des Hundes besteht aus nur einer Hauptkomponente (26,61,108,190), was den Verhältnissen beim menschlichen Hämoglobin entspricht. Glykosylierte Hämoglobine des Hundes wurden mit den für das Glykohämoglobin des Menschen entwickelten Methoden gemessen (107,112,133,134,187,218,219). HIGGINS et al. (103) erbrachten den Nachweis einer in Ketoaminform vorliegenden Hexose. Durch eine chemische Produktanalyse muß diese Hexose noch sicher identifiziert werden.

Die in der Literatur angegebenen Hb A₁-Werte liegen um 1 - 3 % niedriger als diejenigen des Menschen. Dieser Unterschied läßt sich dadurch erklären, daß die Permeabilität für Glukose an der Erythrozytenmembran des Hundes herabgesetzt ist (103).

9.1. Quantifizierung der glykosylierten Hämoglobine bei gesunden, kranken und diabetischen Hunden

Zur Beurteilung der Aussagekraft des Hb A₁-Wertes wurde zunächst ein "Normalbereich" aufgestellt. Bei gesunden Hunden (Gruppe A) wurde mit einem kommerziellen kit ("Hb A₁ Test Combination", Fa. Boehringer Mannheim), der auf dem Prinzip der Mikrosäulenchromatographie basiert, ein durchschnittlicher Hb A₁-Wert von $6,28 \pm 0,98 \%$ ($\bar{x} \pm SD$) gemessen. Die Einzelwerte lagen in einem Bereich von 4,48 - 9,87 %. Der Mittelwert der glykosylierten Hämoglobine liegt um etwa 0,8 % über denen von MAHAFFEY und CORNELIUS (134) und JUNG (112), die ebenfalls mit einer kommerziellen Mikrosäulenteknik (fa. Isolab) die Hb A₁-Werte gesunder Hunde bestimmten. Verantwortlich für diese Differenz kann die Verwendung unterschiedlicher kits bzw. unterschiedlicher Chargen sein. Geringfügige Schwankungen in der Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen könnten diese Ergebnisunterschiede bewirken.

Bei Bestimmungen des Hb A₁-Wertes der Ratte liegen die Mittelwertunterschiede der Untersuchungsergebnisse (170, 178' mit gleichen kits in einer entsprechenden Größenordnung (siehe Tab. 3).

Außerdem kann der Unterschied zusätzlich darin begründet liegen, daß in der vorliegenden Untersuchung auch alte Hunde mit in die Berechnung einbezogen wurden. Bei den vergleichbaren Untersuchungen (112,134) fehlen Angaben über das Alter der Probanden.

9.1.1. Glykosylierte Hämoglobine in verschiedenen Altersstufen

Bei Untersuchungen gesunder Menschen lassen sich Unterschiede des Hb A₁-Wertes in verschiedenen Alterstufen erkennen. PAULSEN und KOURY (157) fanden bei Untersuchungen gesunder Kinder ($6,9 \pm 1,2 \%$) einen um 0,4 % höheren Hb A₁-Wert als bei gesunden Erwachsenen ($6,5 \pm 1,5 \%$). DAVIS et al. (50) fanden ein vergleichbares Ergebnis. Sie unterteilen zusätzlich die Gruppe der Erwachsenen. Bei gesunden Erwachsenen im Alter von 21 - 45 Jahren lag der Hb A_{1c}-Wert bei $5,6 \pm 0,7 \%$, bei gesunden Erwachsenen über 45 Jahren bei $7,1 \pm 0,9 \%$.

Entsprechende Unterschiede konnten in der vorliegenden Arbeit beim Hund beobachtet werden. Signifikante Unterschiede waren bei Hunden ab einem Alter von 7 und mehr Jahren vorhanden. Der Mittelwert der glykosylierten Hämoglobine beim älteren Hund (7 - 15 Jahre, n = 18) lag mit $7,08 \pm 0,96 \%$ deutlich höher als bei den übrigen, jüngeren, gesunden Hunden (1 - 6 Jahre, n = 40). Bei den jüngeren Hunden waren die glykosylierten Hämoglobine mit einem Anteil von $5,96 \pm 0,79 \%$ am Gesamthämoglobin vorhanden. Die Blutglukosekonzentrationen der beiden Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihren Ergebnissen auf. Hier ergaben sich erst ab einem Alter von 8 Jahren Differenzen.

Die Erhöhung des Hb A₁-Wertes mit zunehmendem Alter kann auf einer verminderten Glukosetoleranz beruhen, wie sie beim Menschen bekannt ist. Sie führt zu vorübergehenden hyperglykämischen Zuständen, die sich bei einer einzelnen Nüchternblutzuckerbestimmung jedoch nicht bemerkbar machen. Eine verringerte Glukosetoleranz wurde vom Körper kompensiert. Klinische Erscheinungen treten bei ausreichender Kompensation nicht auf. Temporäre

Stoffwechselentgleisungen bleiben bei diesen Patienten unerkannt.

Die nichtenzymatische Glykosylierung findet auch an anderen Proteinmolekülen statt. Besonders langlebige Proteine unterliegen keinen regelmäßigen Auf- und Abbauprozessen. Hier kann eine Kumulation glykosylierter Proteine stattfinden, die je nach ihrer Menge zu funktionellen Beeinträchtigungen führen kann (188).

Die Kataraktbildung der Linse wird beim Menschen auf eine derartige Veränderung der Proteine zurückgeführt. Sie wurde von CERAMI (41) in vitro nachgewiesen. Ob hierin auch die Ursache für die beim alternden Hund ab einem Alter von 8 Jahren beobachtete Linsentrübung zu sehen ist, müßte durch eine Untersuchung der Glukosetoleranz älterer, subjektiv gesund erscheinender Hunde bzw. an Hand von Tagesprofilen der Blutzuckerkonzentrationen bestätigt werden.

9.1.2. Quantifizierung der glykosylierten Hämoglobine bei kranken, nicht-diabetischen Hunden

Eine Zusammenfassung aller nicht-diabetischen, kranken Hunde ergibt einen mittleren Hb A₁-Wert von $8,41 \pm 2,86 \%$. Er liegt damit signifikant über dem Hb A₁-Mittelwert der gesunden Hunde.

Bei den Hunden mit Fieber und Leukozytose (Gruppe B) wurde ein mittlerer Hb A₁-Wert von $8,63 \pm 2,25 \%$ errechnet. Eine Korrelation zwischen Hb A₁-Wert und dem Ausmaß der Leukozytose konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Gruppen C (Hunde mit Umfangsvermehrungen bzw. Tumoren der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems), E (Hunde mit Lebererkrankungen) und F (Hunde mit Verdacht auf Erkrankungen des exkretorischen Pankreas) weichen in ihren Gruppenmittelwerten nicht oder nur in sehr geringem Maße von dem Mittelwert der Gruppe der gesunden Hunde ab. Bei den Patienten der oben genannten Gruppen sind Phasen ausgeprägter Hyperglykämie, die den Gehalt an glykosylierten Hämoglobinen beeinflussen, nicht zu erwarten.

Bei Hunden mit der Verdachtsdiagnose "Erkrankung des exokrinen Pankreas" liegt der mittlere Hb A₁-Wert mit 6,07 ± 1,21 % niedriger als bei den gesunden Hunden. Möglicherweise spielt hier auch das niedrige Durchschnittsalter dieser Gruppe (3,5 ± 2,25 Jahre) eine Rolle. Die entsprechende Altersgruppe der gesunden Hunde hat einen Hb A₁-Mittelwert von 6,22 % (3 Jahre) bzw. 5,70 % (4 Jahre). Bei Hunden mit einer Umfangsvermehrung bzw. eines Tumors der Leber, der Milz oder des leukopoetischen Systems (Gruppe C) ist nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Hb A₁-Werte im Vergleich zu der Gruppe gesunder Hunde festzustellen. Das Krankheitsgeschehen ist in diesen Fällen zum Teil lokal begrenzt (Leber-, Milztumoren). Auch bei leukopoetischen Systemerkrankungen ist nicht mit einer Beeinflussung des Glukosestoffwechsels zu rechnen. Berücksichtigt werden muß in diesen Fällen auch eine verringerte Lebensdauer der Blutzellen, was der Glykosylierungssummiierung des Hämoglobins durch den frühzeitigen Erythrozytenabbau entgegenwirkt.

Die Gruppe der anämischen Hunde (Gruppe D) weist mit einem Mittelwert von 9,14 ± 3,16 % Hb A₁ einen signifikant höheren Mittelwert als die Gruppe A auf. Dabei sind die Einzelwerte der Probanden sehr großen Schwankungen unterworfen, was an der hohen Standardabweichung erkennbar ist.

In dieser Gruppe müssen zwei Arten der Anämie grundsätzlich voneinander unterschieden werden:

Hund Nr. 1 und 2 fallen durch stark erhöhte Hb A₁-Werte (> 10 %) auf. Bei beiden Patienten war die Anämie iatrogen durch eine Östrogenüberdosierung verursacht worden. Die irreversible Knochenmarksschädigung läßt die körpereigene Blutzellbildung sistieren. Die Zellen des zirkulierenden Blutes sind im Vergleich zu einem Organismus mit funktionsfähigem Knochenmark überaltert (24). Sie enthalten daher einen relativ hohen Anteil an glykosylierten Hämoglobinen. Auch durch eine Bluttransfusion, die bei den Patienten durchgeführt wurde, werden die Hb A₁-Werte nicht herabgesetzt, da nur ausgereifte Erythrozyten hinzugefügt werden.

Gegensätzlich verhält sich der Hb A₁-Wert bei anämischen Patienten, deren Anämie durch einen gesteigerten Erythrozytenabbau hervorgerufen wird. Bei Hund Nr. 7 liegt ein extrem niedriger Hb A₁-Wert vor. Ein Milztumor führte bei ihm zu einem übermäßigen Abbau der Erythrozyten. Bei einer Kontrolluntersuchung, 9 Tage nach Beseitigung der Ursache per operationem, hat sich der Hb A₁-Wert in gleichem Maße (+ 80 %) erhöht wie der Gesamthämoglobingehalt. Der Anstieg der Erythrozyten fiel dagegen deutlich geringer aus (+ 35 %). Bei der Messung wurde nicht zwischen labiler und stabiler Form des Glykohämoglobins unterschieden. Es ist anzunehmen, daß die Zunahme vor allem durch die labile Form der Glykohämoglobine hervorgerufen wird.

Die in der Anämiegruppe zusammengefaßten Patienten lassen sich nur anamnestisch voneinander unterscheiden. Die Befunde der hämatologischen Untersuchungen gleichen sich, mit Ausnahme des Hb A₁-Wertes. Die Ätiologie der Anämien ist unterschiedlich, die Auswirkung auf den Hämoglobin- und Erythrozytengehalt des Blutes jedoch gleich. Hb A₁ wäre hierbei als

Diagnostikum für die Art der Anämie d.h. zur Bestimmung des durchschnittlichen Erythrozytenalters heranzuziehen.

Bei den Hunden der Gruppe G, bei denen eine Erkrankung der Nieren vorlag, wurde ein durchschnittlicher Hb A₁-Wert von $9,05 \pm 1,48$ % errechnet. Der mittlere Nüchternblutzuckergehalt unterschied sich im Gegensatz zum obengenannten Hb A₁-Wert nicht signifikant von dem der gesunden Hunde (Gruppe A). Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen in der Humanmedizin überein. Dort konnte allerdings auch eine Korrelation zwischen dem Kreatininspiegel und der Menge an glykosyliertem Hämoglobin festgestellt werden (175, siehe 3.3.).

Eine befriedigende Erklärung für diese Beobachtung konnte bisher nicht gefunden werden, zumal bei einer vorhandenen Niereninsuffizienz die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt ist und die Hb A₁-Werte demnach unterhalb der Norm liegen müßten (15).

Eine Korrelation der Hb A₁-Werte mit dem Harnstoff- oder mit dem Kreatininwert konnte in der vorliegenden Arbeit für den Hund nicht gefunden werden.

Es wurde jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen Hb A₁-Wert und dem Hämoglobingehalt gefunden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei fortgeschrittener Nierenschädigung durch die Verminderung des Erythropoetins ein verminderter Erythrozytenaufbau, und damit sekundär ein verringerter Hämoglobingehalt entsteht (153).

Bei Hunden mit einer Pseudogravidität (Gruppe H) wurde ein mittlerer Glykohämoglobinanteil von $7,94 \pm 0,76$ % am Gesamthämoglobin festgestellt. Er liegt damit signifikant höher als bei den gesunden Hunden. Die mittleren Nüchternblutzuckerspiegel unterscheiden sich jedoch nicht voneinander. Die Pseudogravidität ist Ausdruck einer Hormonimbalance. Bei weiblichen Hunden mit einem Diabetes mellitus wird ein Einfluß der Läufigkeitsstadien auf das Diabetesgeschehen beobachtet, der sich besonders während der Läufigkeit und im Anschluß daran im Metöstrus bemerkbar macht (67,84). Der bei der Gruppe H festgestellte Anteil an glykosylierten Hämoglobinen ist möglicherweise ein Hinweis auf das Vorliegen eines latenten Diabetes mellitus, der durch Störungen im Hormonhaushalt verursacht wird. Klinisch ist dieser Zustand lediglich als Pseudogravidität und Lactatio falsa mit mäßiger, vom Besitzer kaum bemerkter Polydipsie zu erkennen.

Zusätzlich muß das relativ hohe Durchschnittsalter dieser Gruppe (7,5 Jahre) berücksichtigt werden. Vergleiche zwischen dem Mittelwert der Gruppe der "alten, gesunden Hunde" (7 Jahre und älter, $\bar{x} = 7,05$ %) und dieser Gruppe ergeben einen deutlich geringeren Unterschied zwischen den Hb A₁-Werten. Allerdings ist besonders bei den jüngeren Hunden der Hb A₁-Wert erhöht, sodaß die "physiologische Altersabhängigkeit" keine Rolle zu spielen scheint.

Bei den Hunden, die aufgrund unterschiedlicher Indikationen mit Glucocorticoiden behandelt worden waren, wurde ein mittlerer Hb A₁-Wert von $8,43 \pm 1,81 \%$ errechnet. Der mittlere Nüchternblutzuckerspiegel lag mit $90,44 \pm 38,48 \text{ mg/100 ml}$ über den entsprechenden Werten der gesunden Hunde (Gruppe A), bei denen der mittlere Nüchternblutzuckergehalt bei $85,29 \pm 22,17 \text{ mg/100 ml}$ lag. Dieser Unterschied konnte im Gegensatz zum Hb A₁-Wert statistisch nicht als signifikant gesichert werden. Die Ergebnisse lassen eine glucocorticoid-induzierte Hyperglykämie(84) vermuten, die zu der vermehrten Hämoglobinglykosylierung führte. Da weder der Zeitpunkt noch das verwendete Glucocorticoid einheitlich waren, kann die hyperglykämische Stoffwechsellage schon längere Zeit zurückliegen. Im "Langzeitparameter" Hb A₁ schlägt sich dieser vergangene Zustand noch nieder, während eine aktuelle Blutglukoseerhöhung nicht mehr nachweisbar ist.

Die Gruppe der wegen Herzkrankheiten behandelten Hunde (Gruppe K) zeigt extrem hohe Hb A₁-Werte ($5,72 - 18,13 \%$). Der errechnete Mittelwert von $11,47 \pm 4,37 \%$ Hb A₁ liegt höher als bei allen anderen untersuchten Gruppen mit Ausnahme der Diabetiker.

Die Medikation mit Herzglykosiden führt möglicherweise auf direktem (Anlagerung von Digitoxose) oder indirektem (immunologisch) Weg zu einer Beeinflussung der Meßergebnisse bei der Mikrosäulentechnik. Eine Bindung der Herzglykoside an Proteine, auch an Myoglobin und Hämoglobin, ist bekannt (78).

Das Digoxinmolekül enthält 3 sletene Zucker (Digitoxose) (78). Bei einer Bindung an Hämoglobin ist ein den glykosylierten Hämoglobinen ähnliches chemisch-physikalisches Verhalten bei der Elution denkbar.

Dies könnte zu einem falsch hohen Hb A₁-Wert führen. Eventuell verursacht auch eine vermehrte Anlagerung der Metaboliten der Digitoxose, die beim Abbau freigesetzt werden, die Erhöhung der Hb A₁-Werte (78). Beim Literaturstudium wurden keine Hinweise auf ein entsprechendes Verhalten der glykosylierten Hämoglobine beim Menschen unter Glykosidtherapie gefunden. Von BRIDGES et al. (25) wird jedoch beschrieben, daß bei einer Verabreichung von Acetylsilylsäure über einen längeren Zeitraum eine Acetylierung des Hämoglobins zu erhöhten Hb A₁-Werten führt.

Eine direkte Verbindung zwischen Metaboliten des Digoxin und Hämoglobin erscheint allerdings wegen der geringen Blutkonzentration der Digitoxose unwahrscheinlich. Es lassen sich eher indirekte Beeinflussungen z.B. über immunologische Mechanismen denken (79). Angemerkt werden muß außerdem, daß - bezogen auf das Körpergewicht - die Erhaltungsdosis der Herzglykoside beim Hund (0,01 mg/kg KGW tgl.) mehr als doppelt so hoch ist wie beim Menschen (0,2 mg/Person tgl.) (78). Naturgemäß lag das Durchschnittsalter dieser Gruppe mit 10,5 Jahren sehr hoch. Diese Tatsache hat einen zusätzlichen Einfluß auf die Ergebnisse gehabt. Wenn man vergleichend die Meßwerte der Gruppe A unter Berücksichtigung des Alters betrachtet, sind die Hb A₁-Werte der Gruppe K dennoch deutlich erhöht, während die Nüchternblutzuckerwerte innerhalb der Norm der gesunden Hunde lagen.

9.1.3. Quantifizierung der Hb A₁-Werte bei diabetischen Hunden

Bei den diabetischen Hunden wurde ein mittlerer Hb A₁-Wert aller Einzelwerte von $13,45 \pm 5,20 \%$ errechnet.

Ein Vergleich der Hb A₁-Werte aller untersuchten Gruppen der vorliegenden Arbeit macht deutlich, daß kein Grenzwert angegeben werden kann, der den "Normalbereich" eindeutig vom "diabetischen Bereich" abtrennt. Jedoch unterscheiden sich die Mittelwerte aller Gruppen mit Ausnahme der Gruppe K signifikant von dem Hb A₁-Mittelwert der Diabetiker.

9.2. Möglichkeiten der Überwachung der Diabetes-therapie mit der Hb A₁-Bestimmung unter Praxisbedingungen

Mit der bei der vorliegenden Untersuchung verwendeten Mikrosäulentechnik werden sowohl die labile (Aldiminform) als auch die stabile (Ketoaminform) Form des glykosylierten Hämoglobins bestimmt.

Die Bildung der labilen Form wird von kurzfristigen Blutzuckerschankungen beeinflusst (92). Die stabile Form zeigt erst Veränderungen, wenn hyperglykämische Stoffwechselsituationen über längere Zeit oder wiederholt bestehen (91).

Die beim instabilen Diabetes oftmals stark ausgeprägte Hyperglykämie führt zu einer vermehrten Bildung der labilen Aldiminform und somit zu einem erhöhten Hb A₁-Wert. Phasen der Normo- oder Hypoglykämie senken den Anteil der Aldiminform, führen

jedoch nicht zu einem "Abbau" der stabilen Ketoaminform. Daraus folgt, daß schwer einstellbare Diabetiker mit stark schwankenden Blutzuckerspiegeln einen höheren Hb A₁-Wert aufweisen, als stabil eingestellte Diabetiker, obwohl das Verhältnis der Nüchternblutzuckerwerte umgekehrt sein kann.

Nach den Untersuchungen von JUNG (112) spiegelt der Hb A₁-Wert die durchschnittlichen Nüchternblutzuckerkonzentrationen der vergangenen acht Tage wider. Die untersuchten diabetischen Patienten der Gruppe L zeigten fast alle stark schwankende Nüchternblutzuckerwerte. Die Therapie konnte nur über kurze Zeiträume hinweg befriedigend durchgeführt werden. Häufig wurde kurzfristig eine völlig andere Dosierung aufgrund eines außer Kontrolle geratenen Blutzuckerspiegels notwendig.

Der aktuelle Blutzuckerwert spiegelt in manchen Fällen eine Aufregungssituation (Katecholamin-ausschüttung - Blutzuckeranstieg) (78) oder einen scheinbaren Nüchternzustand (versehentliche, dem Besitzer unbekannte Futteraufnahme) wider. Dieser falsch positive Befund könnte eine Insulinüberdosierung zur Folge haben. Der Hb A₁-Wert bietet uns die Möglichkeit, diese evtl. fatalen Fehlerquellen bei der Überwachung der Diabetestherapie auszuschalten.

Hohe Insulingaben können zur Hypoglykämie - auch ohne typische hypoglykämische Schocksymptome - führen. Sie ist ihrerseits Auslöser für die Freisetzung und Wirkung von Adrenalin, Glukagon und Glucocorticoiden. Das Ergebnis dieser Gegenregulation (Somogyi-Effekt) ist wiederum ein hoher Blutzuckerspiegel, der eine Fehlinterpretation verursachen kann (71). Die Berücksichtigung des Hb A₁-Wertes, der in diesen Fällen erhöht ist,

vermeidet fehlerhafte Therapiekorrekturen.
Die Erkenntnis von JUNG (112), der Hb A₁-Wert gäbe die diabetische Stoffwechsellage der vergangenen 8 Tage wieder, kann in den eigenen Untersuchungen subjektiv, jedoch nicht rechnerisch bestätigt werden, da keine tägliche Blutzuckerkontrolle bzw. keine Tagesprofile unter den gegebenen Praxisvoraussetzungen angefertigt werden konnten.

9.4. Allgemeine Folgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, daß die glykosylierten Hämoglobine des Hundes mit einer in der Humanmedizin routinemäßig angewendeten Mikrosäulentchnik meßbar sind. Die Größenordnung der Ergebnisse ist abhängig von der Bestimmungsmethode und unterscheidet sich daher von den Literaturangaben (Tab. 3).

Eine Beziehung zwischen dem Hb A₁-Wert und dem Lebensalter konnte aufgezeigt werden, was den Verhältnissen beim Menschen entspricht (50). Möglicherweise ist hierfür eine herabgesetzte Glukosetoleranz als Folge von Ermüdungserscheinungen des insulinproduzierenden Gewebes der Bauchspeicheldrüse verantwortlich. Diese Vermutung müßte durch eine Untersuchung der Glukosetoleranz alternder Hunde bestätigt werden.

Bei Hunden mit Nierenerkrankungen wurde ein erhöhter Anteil an glykosylierten Hämoglobinen gefunden, der unabhängig vom Nüchternblutzuckerspiegel war. Auch dieses Ergebnis entspricht Beobachtungen in der Humanmedizin (175).

Bei Hunden mit einer Hormonstörung (Pseudogravidität) und bei Hunden, die unter der Wirkung von Glukokortikoiden gestanden hatten oder noch standen, wurden vermehrt glykosylierte Hämoglobine gefunden. Ursächlich wird hier auf das Vorliegen eines latenten bzw. glucocorticoid-induzierten Diabetes mellitus geschlossen.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen von WOOD und SMITH (218) und JUNG (112) wurde eine Änderung der

Hb A₁-Werte bei diabetischen Hunden innerhalb von 8 Tagen beobachtet. Dadurch ist eine Beurteilung der Stoffwechsellage eines Diabetikers nicht mehr allein vom aktuellen Blutglukosespiegel abhängig. Beide Parameter fließen in die Beurteilung mit ein und geben wertvolle Hilfestellung bei der Therapieänderung.

Auch in der Diagnostik des Diabetes mellitus beim Hund ist die Hb A₁-Bestimmung hilfreich. So muß bei manchem Patienten berücksichtigt werden, daß durch den vorangegangenen "Streß", wie ihn der Aufenthalt im Wartezimmer oder die vorangegangene klinische Allgemeinuntersuchung vielfach darstellt, oder durch Widersetzlichkeit und Unruhe des Patienten bei ängstlichen und leicht erregbaren Hunden fälschlicherweise erhöhte Blutzuckerwerte gemessen werden können. Die Fehldiagnose Diabetes mellitus könnte die Folge sein.

Denkbar sind auch Fehlinterpretationen eines erhöhten Blutzuckerspiegels, wenn nicht sicher gewährleistet ist, daß der Hund nüchtern zur Untersuchung vorgestellt wird. Sicherlich achten nicht alle Besitzer streng auf dieses Gebot.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war unter anderem herauszufinden, ob und welche Erkrankungen oder Therapiemaßnahmen zu Normabweichungen des Hb A₁- Wertes führen können.

Tatsächlich konnten einige Zustandsbilder aufgezeigt werden, die bei alleiniger Messung und Beurteilung des Hb A₁-Wertes auf das Vorliegen eines Diabetes mellitus schließen ließen (Gruppe G,H,I,K). Diese Gruppen zeigten jedoch normale Nüchternblutzuckerspiegel.

Der Hb A₁-Wert ist also weniger zur "Erstdiagnostik" als Suchmethode für den Diabetes mellitus geeignet. Er muß immer im Zusammenhang mit dem Blutglukosespiegel gesehen werden. Allerdings scheint er sehr hilfreich für die Therapiekontrolle diabetischer Hunde zu sein. Er ist dabei dem aktuellen Nüchternblutzuckerwert an Aussagekraft überlegen. Zur medizinisch relevanten Darstellung eines diabetischen Zustandbildes kann die Erstellung eines Blutglukosetagesprofils in Verbindung mit dem Hb A₁-Wert gelten.

Die Untersuchung der Patientenblutproben mit der hier verwendeten Mikrosäulenmethode ist sicherlich in der tierärztlichen Praxis durchführbar. Das Untersuchungsergebnis ist aussagefähig, wenn die Bestimmung genau standardisiert durchgeführt wird. Erforderlich ist dazu eine gewisse Einarbeitung des Untersuchers und damit verbunden eine entsprechende Menge anfallender Proben. Viele Krankenhäuser verfügen über die labortechnischen Voraussetzungen, so daß auch dort diese Bestimmung durchgeführt werden könnte.

Für die kurative Praxis ist auch der finanzielle Aspekt von Belang. Die Hb A₁-Bestimmung ist - im Verhältnis zu den gebräuchlichen Labormethoden - eine relativ kostspielige Untersuchungsmethode. Von ihrer Notwendigkeit kann jedoch der Besitzer eines diabetischen oder diabetesverdächtigen Hundes überzeugt werden.

10. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer Feldstudie mit einer mikrosäulenchromatographischen Bestimmungsmethode der prozentuale Anteil der glykosylierten Hämoglobine (Hb A_1) am Gesamthämoglobin beim Hund gemessen und ihr Verhalten bei unterschiedlichen physiologischen, pathologischen und therapeutischen Zustandsbildern untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt :

1. Bei 58 gesunden Hunden wurden Hb A_1 -Werte zwischen 4,48 - 9,87 %, mit einem Mittelwert von $6,28 \pm 0,98$ %, gemessen.

Es wurde eine Erhöhung des glykosylierten Hämoglobinantels mit zunehmendem Lebensalter (ab 7 Jahren) festgestellt.

2. Bei kranken, nicht-diabetischen Hunden lagen die Hb A_1 -Werte zwischen 2,6 - 18,13 %, mit einem Mittelwert von $8,41 \pm 2,86$ %.

Eine Erhöhung des glykosylierten Hämoglobins wurde bei Hunden mit Nierenerkrankungen, bei Hunden, die mit Glucocorticoiden behandelt worden waren, bei weiblichen Hunden mit Hormonstörungen und bei kardialgeschädigten Patienten, die mit Digitalispräparaten behandelt wurden, festgestellt.

Unterschiede zwischen den einzelnen Zustandsbildern und dem Hb A_1 -Wert wurden diskutiert.

3. Bei 19 diabetischen Hunden wurden Hb A_1 -Werte von 7,16 - 34,6 % gemessen. Der Mittelwert lag bei $13,45 \pm 5,2$ %. Eine Beziehung zwischen Nüchternblutzuckerspiegeln der vergangenen 8 - 10 Tage und dem Hb A_1 -Wert ließ sich subjektiv feststellen, nicht jedoch rechnerisch bestätigen.

SUMMARY

GLYCOSYLATED HEMOGLOBINS IN DOGS IN DIFFERENT PHYSIOLOGICAL, PATHOLOGICAL AND THERAPEUTICAL CASES

A microcolumn-ion-exchange-chromatographic method was used for determining the percentage of glycosylated hemoglobin in the total hemoglobin of dogs.

The following results were determined :

1. In 58 healthy dogs the Hb A₁-concentration ranged between 4.48 - 9.87 % with a mean average of 6.28 % (+ or - 0.98 %).

There was an increase in the concentration of Hb A₁ with increasing age which was clearly identifiable at age 7.

2. In 90 diseased, nondiabetic dogs the Hb A₁-concentration ranged between 2.6 - 18.13 % with an mean average of 8.41 % (+ or - 2.86 %).

An increased concentration of Hb A₁ was observed in (1) dogs with renal failure, (2) female dogs with hormonal imbalance, (3) dogs treated with corticosteroids and (4) dogs with cardiac disease treated with digoxin.

Different concentration of Hb A₁ within the groups studied were considered.

3. A group of 19 diabetic dogs showed Hb A₁-concentrations with a range of 7.16 - 34.6 %. The mean average was determined to be 13.45% (+ or - 5.2 %). During the 10 days preceeding the calculations a relationship between the plasma glucose content and the Hb A₁-concentration was observed, but not specifically measured.

11. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham, E.C.; Huff, T.A.; Cope, N.D.; Wilson, J.B.;
Bransome, E.D.; Huisman, T.H.:
Determination of the glycosylated hemoglobins (Hb A1)
by a new microcolumn procedure.
Diabetes 27, 931 - 937 (1978)
2. Aleyassine, H.:
Glycosylation of hemoglobin S or C.
Clin. Chem. 26, 526 - 527 (1980)
3. Aleyassine, H.; Gardiner, R.J.; Tonks, D.B.; Koch, P.:
Glycosylated hemoglobin in diabetes mellitus:
Correlation with fasting plasma glucose, serum lipids,
and glycosuria.
Diabetes Care 3, 508 - 514 (1980)
4. Allen, D.W.; Schroeder, W.A.; Balog, J.:
Observation on the chromatographic heterogeneity of
normal, adult and fetal human hemoglobin : A study
of the effects of crystallization and chromatography
on the heterogeneity and isoleucine content.
J. Am. Chem. Soc. 80, 1628 - 1634 (1958)
5. Antholine, W.E.; Mauk, A.G.; Swartz, H.M.; Taketa, F.:
Electron spin resonance of feline NO-hemoglobins.
FEBS Lett. 36, 199 - 202 (1973)
6. Bartley, P.C.:
Hemoglobin A1 in diabetes mellitus.
Austr. N.Z.J. Med. 9, 49 - 53 (1979)
7. Basset, P.; Braconnier, F.; Rosa, J.:
An update on electrophoretic and chromatographic
methods in the diagnosis of hemoglobinopathies.
J. Chromatogr. 227 (2), 267 - 304 (1982)

8. Baule, G.M.; Onorato, D.; Tola, G.; Forteleoni, G.;
Tullio, M.:
Hemoglobin A1 in subjects with G-6-PD deficiency
during and after hemolytic crises due to favism.
Acta haemat. 69, 15 - 18 (1983)
9. Beccaria, L.; Chiomello, G.; Gianazza, E.; Lippis, B.;
Righetti, P.G.:
Hemoglobin A1 separation by isoelectric focusing.
Am. J. Hematol. 4, 367 - 374 (1978)
10. Berger, W.; Sonnenberg, G.E.:
Blutzuckertagesprofile und Hämoglobin A1 bzw. A1c
zur Überwachung der Diabetesbehandlung.
Schweiz. med. Wschr. 110, 485 - 491 (1980)
11. Bernstein, R.E.:
Glycosylated hemoglobins: Hematologic considerations
determine which assay for glycohemoglobin is advisable.
Clin. Chem. 26, 174 - 175 (1980)
12. Boehringer Mannheim GmbH
Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufskontrolle
Herausgegeben von Boehringer Mannheim GmbH (1978)
13. Boehringer Mannheim GmbH
Testfibel Hämoglobin A1
Herausgegeben von Boehringer Mannheim GmbH (1981)
14. Boehringer Mannheim GmbH
Arbeitsanleitung Gluco-quant
Herausgegeben von Boehringer Mannheim GmbH (1982)
15. de Boer, M.J.; Miedema, K.; Casparie, A.F.:
Glycosylated hemoglobin in renal failure.
Diabetologia 18, 437 - 440 (1980)

16. Bolli, G.; Cartechini, M.; Compagnucci, P.; Santensanio, F.:
Modification of glycosylated hemoglobin concentration
during artificial endocrine pancreas treatment of
diabetics.
Diabetologia 18, 125 - 130 (1980)
17. Bolli, G.; Compagnucci, P.; Cartechini, M.; Brunetti, P.:
Hb A1 in subjects with abnormal glucose tolerance
but normal fasting plasma glucose.
Diabetes 29, 272 - 277 (1980)
18. Bookchin, R.M.; Gallop, P.M.:
Structure of hemoglobin A1c: Nature of the N-terminal
 β -chain blocking group.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 86 - 93 (1968)
19. Boucher, B.J.; Walten, C.; Welch, S.G.; Barnett, J.S.;
Yudkin, J.S.; Monson, J.P.:
Diabetic control on once- and twice-daily Insulin
injections.
Diabetologia 19, 485 (1980)
20. Boucher, B.J.; Welch, S.G.:
Measuring glycosylated hemoglobin concentrations
in a diabetic clinic.
Br. Med. J. I, 150 (1981)
21. Boucher, B.J.; Welch, S.G.; Beer, M.S.:
Glycosylated hemoglobins in the diagnosis of Diabetes
mellitus and for the assessment of chronic hyperglycaemia.
Diabetologia 21, 34 - 36 (1981)
22. Bottermann, P.:
Rapid fluctuations in glycosylated hemoglobin
concentration.
Diabetologia 20, 159 (1981)

23. Bowen, T.:
Fast moving hemoglobin.
Med. J. Austr. I, 23 (1979)
24. Brass, W.; Kersten, U.; Rahlfs, I.; Schütt, I.;
Wirth, W.:
Kompendium der Kleintierkrankheiten.
2. Auflage, Verlag Schaper, Hannover (1981)
25. Bridges, K.R.; Schmidt, G.J.; Jensen, M.;
Cerami, A.; Bunn, H.F.:
The acetylation of hemoglobin by aspirin
in vitro and in vivo.
J. Clin. Invest. 56, 201 - 207 (1975)
26. Brimhall, B.; Duerst, M.; Jones, R.T.:
The amino acid sequence of dog (*Canis familiaris*)
hemoglobin.
J. Mol. Evol. 9, 231 - 235 (1977)
27. Brimhall, B.; Stenzel, P.; Dresler, S.L.; Jones, R.T.:
On the tryptic peptides from hemoglobin chains
of six carnivores.
J. Mol. Evol. 9, 237 - 260 (1977)
28. Brooks, A.P.:
Changes in glycosylated hemoglobin after poor
control in insulin-dependent diabetics.
Br. Med. J. II, 707 - 710 (1980)
29. Brooks, A.P.; Metcalfe, J.; Day, J.C.; Edwards, M.S.:
Iron deficiency and glycosylated hemoglobin A₁.
Lancet II, 141 (1980)

30. Bunn, H.F.:
Differences in the interaction of 2,3-di-phosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins.
Science 172, 1049 - 1050 (1971)
31. Bunn, H.F.; Haney, D.N.; Gabbay, K.H.; Gallop, P.M.:
Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 103 - 109 (1975)
32. Bunn, H.F.; Haney, D.N.; Kamin, S.; Gabbay, K.H.; Gallop, P.M.:
The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}.
J. Clin. Invest. 57, 1652 - 1659 (1976)
33. Bunn, H.F.; McDonald, M.J.:
Glycosylation of human hemoglobin.
in: Caughey, W.S. (ed.):
Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities.
Academic Press Inc. New York (1978)
34. Bunn, H.F.; Gabbay, K.H.; Gallop, P.M.:
The glycosylation of hemoglobin :
Relevance to Diabetes mellitus.
Science 200, 21 - 27 (1978)
35. Bunn, H.F.; Shapiro, R.; McManus, M.; Garrick, L.; McDonald, M.J.; Gallop, P.M.; Gabbay, K.H.:
Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation.
J. Biol. Chem. 254, 3892 - 3898 (1979)

36. Bunn, H.F.:
Nonenzymatic glycosylation of protein :
Relevance to diabetes.
Am. J. Med. 70, 325 - 330 (1981)
37. Bunn, H.F.:
Evaluation of glycosylated hemoglobin in
diabetic patients.
Diabetes 30, 613 -617 (1981)
38. Burrin, J.M.; Worth, L.A.; Ashworth, S.C.;
Alberti, K.G.M.:
Automated colorimetric estimation of
glycosylated hemoglobins.
Clin. Chem. Acta 106, 45 - 50 (1980)
39. Cannon, D.J.; Conaway, H.H.:
Glycosylated hemoglobin levels in a colony of
spontaneously diabetic rabbits.
Diabetologia 20, 242 - 243 (1981)
40. Casparie, A.F.; Miedema, K.:
Glycosylated hemoglobin in diabetes and renal
failure.
Lancet II, 758 - 759 (1977)
41. Cerami, A.:
The formation of Hb A1c as a biochemical model
for the sequelae of diabetes.
Prog. Clin. Biol. Res. 21, 33 -45 (1978)
42. Chou, J.:
Simple method for estimation glycosylated
hemoglobins, and its application to evaluation
of diabetic patients.
Clin. Chem. 24, 1708 -1710 (1979)

43. Clarke, J.T.; Canivet, J.:
Hemoglobin Alc separation by microcolumn
chromatography: A new rapid method of assay.
Diabète Metab. 5, 293 -296 (1979)
44. Clegg, M.D.:
A chromatographic study of the minor components
of normal human hemoglobin including a comparison
of hemoglobin from normal and phenylketonuric
individuals.
J. Am. Chem. Soc. 81, 6065 - 6069 (1959)
45. Cole, R.A.; Soeldner, J.S.; Dunn, D.J.; Bunn, H.F.:
A rapid method for the determination of glyco-
sylated hemoglobins using pressure liquid
chromatography.
Metabolism 27, 289 -301 (1978)
46. Daneman, K.; Tsalikian, E.; Hengstenberg, F.;
Becker, D.; Drash, A.:
Glycosylated hemoglobin in children with
Insulin-dependent Diabetes mellitus.
Diabetologia 19, 423 - 426 (1980)
47. Das, S.N.:
Note on the acute effect of hydrocortisone
on insulin sensitivity in dogs with alloxan
diabetes.
Indian J. Anim. Sci. 52, 852 - 853 (1982)
48. Daubresse, J.C.; Lenny, C.; Bailly, A.; Meunier, J.C.:
The usefulness of a rapid method for total fast
hemoglobins determination in screening for
diabetes control.
Diabète Metab. 5, 301 - 305 (1979)

49. Davis, R.E.; Nicol, B.:
A rapid simplified method for routine measurement
of glycosylated hemoglobin.
Lancet II, 350 -351 (1978)
50. Davis, J.E.; McDonald, J.M.; Jarett, L.:
A high-performance liquid chromatography
for hemoglobin A1c.
Diabetes 27, 102 - 107 (1978)
51. Day, J.F.; Ingebretsen, C.G.; Ingebretsen, W.R.;
Baynes, J.W.; Thorpe, S.:
Nonenzymatic glycosylation of Serum proteins
and hemoglobin: Response to changes in blood
glucose levels in diabetic rats.
Diabetes 29, 524 - 527 (1980)
52. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft:
Arbeitswerte in der Labordiagnostik.
Tierärztl. Praxis 4, 83 - 102 (1976)
53. Ditzel, J.; Kjaeregaard, J.J.:
Hemoglobin A1c concentrations after initial
insulin treatment for newly discovered diabetes.
Br. Med. J. I, 741 -742 (1978)
54. Ditzel, J.; Kjaeregaard, J.J.:
Rapid fluctuations in glycosylated hemoglobin
concentrations as related to acute changes in
blood glucose.
Diabetologia 19, 403 - 404 (1980)

55. Dix,D.; Cohen,P.; Kingsley,S.; Senkblei,J;
Sexton,K.:
Glycohemoglobin and glucose tolerance tests
compared as indicators of borderline diabetes.
Clin. Chem. 25, 877 - 879 (1979)
56. Dods,R.F.; Bolmey,C.:
Glycosylated hemoglobin assay and oral glucose
tolerance test compared for detection of
Diabetes mellitus.
Clin. Chem. 25, 764 - 768 (1979)
57. Dolhofer,R.; Städele,A.; Wieland,O.H.:
Clinical and biochemical studies on the
significance and formation of hemoglobins A1c
and Ala+b in Diabetes mellitus.
Klin. Wschr. 55, 945 - 954 (1977)
58. Dolhofer,R.; Wieland,O.H.:
In vitro glycosylation of hemoglobins by
different sugars and sugar phsophates.
FEBS Lett. 85, 86 -90 (1978)
59. Dolhofer,R.; Wieland,O.H.:
Increased glycosylation of serum albumin in
Diabetes mellitus.
Diabetes 29, 417 - 422 (1980)
60. Dresler,S.L.; Runkel,D.; Stenzel,R.; Brimhall,B.;
Jones,R.T.:
Multiplicity of the hemoglobin alpha chains
in dogs and variations among related species.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 241, 411 - 415 (1975)

61. Dresler, S.L.; Brimhall, B.; Jones, R.T.:
Multiple struktural genes for the alpha
chains of canine (*Canis familiaris*) hemoglobin.
Biochem. Genet. 14, 1065 - 1070 (1976)
62. Dumm, P.J.:
Reproducibility of hemoglobin Alc and sensitivity
to various degree of glucose tolerance.
Ann. Intern. Med. 91, 376 - 379 (1979)
63. Editorial:
Hämoglobin-Glucose-Bindung : Code zum mittleren
Blutzuckerwert.
Selekta, 4593 - 4598 (1978)
64. Editorial:
Hemoglobin A1 and diabetes: A reappraisal.
Br. Med. J. II, 1304 - 1305 (1980)
65. Editorial:
Glykohämoglobin.
DMW 106, 259 - 261 (1981)
66. Eigenmann, J.E.:
Metabole und endokrine Ursachen neurologischer
Erkrankungen.
Vortrag auf der 29. Jahrestagung der DVG;
Hannover 3. - 5. November 1983, Referateband S. 8
67. Eigenmann, J.E.:
Diabetes mellitus bei der Hündin.
Tierärztl. Prax. 11, 529 - 536 (1983)

68. Ellul, D.A.:
Glycosylated hemoglobin: A literature review.
Am. J. Med. Technol. 46, 657 - 661 (1980)
69. Enoki, Y.; Ohga, Y.; Kaneko, A.; Kohzuki, H.:
Characterization and quantitation of glycosylated hemoglobins.
Hemoglobin 6, 143 - 151 (1982)
70. Erhardt, W.; Jung, G.; Goebel, F.D.:
Integrale Stoffwechselkontrolle durch die Bestimmung der glykosylierten Hämoglobine beim diabetischen Hund.
Vortrag auf der 27. Jahrestagung der DVG;
München, 29. - 31. Oktober 1981,
Referateband S. 200 - 206
71. Feldman, E.C.; Nelson, R.W.:
Insulin-induced hyperglycemia in diabetic dogs.
J. Am. Vet. Med. Ass. 180, 1432 - 1437 (1982)
72. Fischer, R.W.; Jong, C.; Voigt, E.; Berger, W.; Winterhalter, K.H.:
The colorimetric determination of Hb A1c in normal and diabetic subjects.
Clin. Lab. Haematol. 2, 129 - 138 (1980)
73. Fitzgerald, M.D.:
Glycosylated hemoglobins in patients with hemoglobinopathy.
Clin. Chem. 26, 360 - 361 (1980)
74. Flückiger, R.; Winterhalter, K.H.:
Hemoglobin A1c synthesis in vitro.
FEBS Lett. 72, 356 - 360 (1976)

75. Flückiger, R.; Winterhalter, K.H.:
Glycosylated hemoglobins.
in: Caughey, W.S. (ed.):
Biochemical and clinical aspects of hemoglobin
abnormalities.
Academic Press Inc. New York (1977)
76. Flückiger, R.:
Struktur, Funktion und Synthese von Hämoglobin Alc.
Inauguraldissertation, Basel 1978
77. Flückiger, R.; Harmon, W.; Meier, W.; Loo, S.;
Gabbay, K.H.:
Hemoglobin carbamylation in Uremia.
N. Engl. J. Med. 304, 823 - 827 (1981)
78. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und
Toxikologie.
4. Auflage, Wissenschaftsverlag Mannheim,
Wien, Zürich (1983)
79. Forth, W.:
pers. Mitteilung (1984)
80. Fraser, D.M.:
Glycosylated hemoglobin concentrations in newly
diagnosed diabetics before and during treatment.
Br. Med. J. I, 979 - 981 (1979)
81. Friedman, S.:
A simple microchromatographic column for
determination of hemoglobin A1 a+b and Alc.
Hemoglobin 3, 411 - 428 (1979)

82. Gabbay, K.H.; Hasty, K.; Breslow, J.L.; Ellison, R.C.;
Bunn, H.F.; Gallop, P.M.:
Glycosylated hemoglobin and longterm blood
glucose control in Diabetes mellitus.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 - 864 (1977)
83. Gabbay, K.H.; Sosenko, J.M.; Banucki, G.A.;
Mininsohn, M.; Flückiger, R.:
Glycosylated hemoglobins: Increased glycosylation
of hemoglobin A in diabetic patients.
Diabetes 28, 337 - 340 (1979)
84. Gärtner, K.:
Untersuchungen zur Disposition der Hündin
für Diabetes mellitus.
Zbl. Vet. Med. A. 15, 517 - 527 (1968)
85. Gale, E.A.M.; Walford, S.; Tattersall, R.B.:
Nocturnal hypoglycaemia and hemoglobin A₁.
Lancet II, 1240 - 1241 (1979)
86. Gain, T.:
Ein Routineverfahren zur chromatographischen
Hb A₁-Bestimmung mittels Mikrosäulentechnik.
Klin. Wochenschr. 59, 219 - 228 (1981)
87. Gain, T.; Bottermann, P.:
Schwankungen glykosylierter Hämoglobine in
Abhängigkeit von der aktuellen Blutzucker-
konzentration.
DMW 106, 1010 (1981)
88. Gain, T.:
Erfahrungen mit der Hb A₁-Bestimmung.
"diagnostica dialog" 1/82, Boehringer Mannheim GmbH

89. Garrick, L.M.:
Structural analysis of the minor human
hemoglobin components: Hb A1, Hb A1a, Hb A1b.
Eur. J. Biochem. 106, 353 - 359 (1980)
90. Goebel, F.D.; Füssl, H.; Kolmar, C.; Dörfler, H.:
Studies of the biosynthesis of hemoglobin A1.
Diabetologia 19, 277 (1980)
91. Goebel, F.D.; Füssl, H.; Seidl, O.:
Möglichkeiten der Langzeitkontrolle von Stoff-
wechselkrankheiten.
MMW 122, 1731 - 1734 (1980)
92. Goebel, F.D.; Füssl, H.:
Zur Relevanz der reversiblen Form der
Glykohämoglobine für die Langzeitkontrolle
des Diabetes mellitus.
Akt. Endokrinol. 2, 90 (1981)
93. Goebel, F.D.; Füssl, H.; Dörfler, H.; Kolmar, C.:
Short-term changes of glycosylated hemoglobins
during glucose administration in healthy and
diabetic subjects.
Res. Exp. Med. 179, 133 - 140 (1981)
94. Goldstein, D.E.:
Hemoglobin A1c levels in children and adolescents
with Diabetes mellitus.
Diabetes Care 3, 503 - 507 (1980)
95. Goldstein, D.E.; Peth, S.B.; England, J.D.;
Hess, R.L.; DaCosta, J.:
Effects of acute changes in blood glucose on
Hb A1c.
Diabetes 29, 623 - 628 (1980)

96. Gonen, B.; Rubenstein, A.H.; Rochman, H.; Tanega, S.P.;
Horwitz, D.L.:
Hemoglobin A1: An indicator of the metabolic
control of diabetic patients.
Lancet II, 734 - 736 (1977)
97. Graf, R.J.; Halter, J.B.; Porte, D.:
Glycosylated hemoglobin in normal subjects and
subjects with maturity-onset Diabetes.
Diabetes 27, 834 - 838 (1978)
98. Graf, R.J.:
Glycosylated hemoglobin in renal failure.
Diabetologia 19, 555 - 556 (1980)
99. Guthrow, C.E.; Morris, M.A.; Day, J.F.; Thorpe, S.R.;
Baynes, J.W.:
Enhanced nonenzymatic glycosylation of human
serum albumin in Diabetes mellitus.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4258 - 4261 (1979)
100. Henrichs, H.R.:
Hb A1 in der Diabetes-Diagnostik.
"diagnostica dialog" 2/81, Boehringer Mannheim GmbH
101. Henrichs, H.R.:
Neue methodische Aspekte der Hb A1-Bestimmung.
Akt. Endokrin. 2, 124 (1981)
102. Herrmann, F.H.; Herrmann, C.:
Das Hämoglobin des Menschen : Struktur, Funktion,
Genetik.
Fr. Vieweg-Verlag, Braunschweig, 1980

103. Higgins, P.J.; Garlick, R.L.; Bunn, H.F.:
Glycosylated hemoglobin in human and animal
red cells (Role of glucose permeability).
Diabetes 31, 743 - 748 (1982)
104. Holmquist, W.R.; Schroeder, W.A.:
A new N-terminal blocking group involving
a Schiff base in hemoglobin Alc.
Biochemistry 5, 2489 - 2503 (1966)
105. Huisman, T.H.J.; Dozy, A.M.:
Studies on the heterogeneity of hemoglobin:
Binding of hemoglobin with oxidized glutathione.
J. Lab. Clin. Med. 60, 302 - 319 (1962)
106. Huisman, T.H.J.; Horton, B.F.:
Studies on the heterogeneity of hemoglobin:
Chromatographic and electrophoretic investigations
of various minor hemoglobin fractions present in
normal and in vitro modified red blood cell
hemolysates.
J. Chromatogr. 18, 116 - 123 (1965)
107. Javid, J.; Pettis, P.K.; Koenig, R.J.; Cerami, A.:
Immunologic characterization and quantification
of hemoglobin Alc.
Br. J. Haematol. 38, 329 - 337 (1978)
108. Jones, R.T.; Brimhall, B.; Duerst, M.:
Amino acid sequence of the alpha and beta
chains of dog hemoglobin.
Fed. Proc. 30, 1259 (1971)

109. Jongeneel, J.:
Optimizing measurement of glycosylated hemoglobins.
Clin. Chim. 25, 642 (1979)
110. Jonsson, A.; Wales, J.:
Glycosylated hemoglobin and diabetic control.
Br. Med. J. II, 629 (1978)
111. Jovanovic, L.; Peterson, C.M.:
The clinical utility of glycosylated hemoglobin.
Am. J. Med. 70, 331 - 338 (1981)
112. Jung, G.:
Glykosylierte Hämoglobine und Blutzuckerwerte zur Überwachung der diabetischen Stoffwechsellage beim Hund.
Vet. Med. Diss., München 1983
113. Kaneko, J.J.; Mattheeuws, D.; Rottiers, R.P.; Vermeulen, A.:
Renal function, insulin secretion, and glucose tolerance in mild streptozotocin Diabetes in dog.
Am. J. Vet. Res. 39, 807 - 809 (1978)
114. Kennedy, A.L.; Kandell, T.W.; Merimee, T.J.:
Serum protein-bound hexose in Diabetes
The effect of glycemic control.
Diabetes 28, 1006 - 1010 (1979)
115. Kennedy, A.L.:
Non-enzymatically glycosylated serum protein in Diabetes mellitus: An index of short-term glycaemia.
Diabetologia 21, 94 - 98 (1981)

116. Kesson, C.M.; Whitelaw, J.W.; Ireland, J.T.:
Drug-induced hemolysis and fast hemoglobin A1
in Diabetes mellitus.
Br. Med. J. II, 1037 - 1038 (1979)
117. Koenig, R.J.; Cerami, A.:
Synthesis of hemoglobin A1c in normal and
diabetic mice - potential model of basement
membrane thickening.
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3687 - 3691 (1975)
118. Koenig, R.J.; Peterson, C.M.; Kilo, C; Cerami, A.;
Williamson, J.R.:
Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of
glucose intolerance in Diabetes.
Diabetes 25, 230 - 231 (1976)
119. Kraft, W.; Dürr, U.M.:
Kompendium der klinischen Laboratoriums-
diagnostik bei Hund, Katze, Pferd.
2. erweiterte Auflage, Verlag Schaper, Hannover
(1981)
120. Krishnamoorthy, R.; Gacon, G.; Labie, D.:
Isolation and partial characterization of
hemoglobin Alb.
FEBS Lett. 77, 99 - 102 (1977)
121. Kinkel, H.G.; Wallenius, G.:
New hemoglobin in normal adult blood.
Science 122, 288 (1955)
122. Kutnikar, G.S.; Hegde, V.R.:
Studies on canine hemoglobin : Peptide
maps of alpha and beta chains.
Mysore J. Agric. Sci. 9, 317 - 319 (1975)

123. Kutter, D.:
Aplication du dosage des hemoglobines "rapides"
à la surveillance et au diagnostic du diabète
sucré.
Schw. Med. Wschr. 109, 1107 - 1109 (1979)
124. Kynoch, P.A.M.; Lehmann, H.:
Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated
hemoglobin for routine purposes.
Lancet II, 16 (1977)
125. Labie, D.:
Glycosylation non-enzymatique de l' hémoglobine
chez le sujet normal et diabetique.
C. R. Soc. Biol. 173, 321 - 330 (1979)
126. Lantz, B.:
Minor hemoglobin fraction in uraemic and in
diabetic patients.
Diab. Metab. 7, 109 - 114 (1981)
127. Lécomte, M.J.; Schoos, R.; Schoos-Barbette, S.;
Luyckx, A.S.; Labotte, C.; Lefebvre, P.J.:
Hémoglobine Alc et controle du diabète.
Diabète Metab. 5, 57 - 61 (1979)
128. Leslie, R.D.G.; Pyke, D.A.; John, P.A.; White, J.M.:
How quickly can hemoglobin A1 increase ?
Br. Med. J. II, 19 (1979)
129. Leslie, R.D.G.; Pyke, D.A.; John, P.A.; White, J.M.:
Fast glycosylation of hemoglobin.
Lancet I, 773 - 774 (1979)

130. Lessard, J.L.; Taketa, F.:
Multiple hemoglobins in fetal, newborn and
adult cats.
Biochem. Biophys. Acta 175, 441 - 444 (1969)
131. Lev-Ran, A.; Van der Laan, W.P.:
Glycohemoglobins and glucose tolerance.
JAMA 241, 912 - 914 (1979)
132. Little, R.R.; Parker, K.M.; England, J.D.;
Goldstein, D.E.:
Glycosylated hemoglobin in *Mystromys albicaudatus*:
A diabetic animal model.
Lab. Anim. Sci. 32, 44 - 47 (1982)
133. Mahaffey, E.A.; Cornelius, L.M.:
Evaluation of a commercial kit for measure-
ment of glycosylated hemoglobin in canine blood.
Vet. Clin. Pathol. 10, 21 - 24 (1981)
134. Mahaffey, E.A.; Cornelius, L.M.:
Glycosylated hemoglobin in diabetic and
nondiabetic dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 635 - 637 (1982)
135. Mank, J.G.; Whelau, H.; Putz, G.R.; Taketa, F.:
Anemia in domestic cats: Effect on hemoglobin
components and whole blood oxygenation.
Science 185, 447 - 449 (1974)
136. Maquart, F.:
A method of specifically measuring hemoglobin Alc
with a disposable commercial ion-exchange column.
Clin. Chim. Acta 108, 329 - 332 (1980)

137. Marmor, M.; Willeberg, P.; Glickman, L.;
Priester, W.; Cypess, R.; Hurvitz, A.:
Epizootologic patterns of Diabetes mellitus
in dogs.
Am. J. Vet. Res. 43, 465 - 470 (1982)
138. McDonald, M.J.; Shapiro, R.; Bleichmann, M.;
Solway, J.; Bunn, H.F.:
Glycosylated minor components of human adult
hemoglobin.
J. Biol. Chem. 253, 2327 - 2332 (1978)
139. McDonald, M.J.; Davis, J.E.:
Glycosylated hemoglobins and Diabetes mellitus.
Hum. Pathol. 10, 279 - 291 (1979)
140. McFarland, K.F.; Catalano, E.W.; Day, J.F.;
Thorpe, S.; Baynes, J.:
Nonenzymatic glycosylation of serum proteins
in Diabetes mellitus.
Diabetes 28, 1011 - 1014 (1979)
141. McVerry, B.A.; Fisher, C.; Hopp, A.; Huehns, E.R.:
Production of pseudodiabetic renal glomerular
changes in mice after repeated injections of
glycosylated proteins.
Lancet I, 738 - 740 (1980)
142. Menard, L.:
Quantitative determination of glycosylated
hemoglobin A1 by agar gel electrophoresis.
Clin. Chem. 26, 1598 - 1602 (1980)
143. Menez, J.F.:
Adaptation d'une chaine technicon type AA_{II}
au dosage de l'hémoglobine A1c.
Ann. Biol. Clin. 37, 374 - 376 (1979)

144. Miller, J.M.; Bunn, H.F.:
Hemoglobin Alc in normal and diabetic pregnancy.
JAMA 242, 2785 - 2787 (1979)
145. Moore, E.G.; Horwitz, D.L.; Sheftel, D.; Straube, R.;
Unterman, T.; Chertack, M.:
Control of Diabetes at a summer camp: Assessment
by hemoglobin A1 and other measures.
Diabetes 29 (Suppl.2), 70 A (1980)
146. Moore, E.G.; Stroupe, S.D.; Blecka, L.J.:
Automated spectrophotometric assay for glyco-
sylated hemoglobin.
Diabetes 29, (Suppl. 2), 70 A (1980)
147. Morrison, M.; Cook, J.L.:
Chromatographic fractionation of normal adult
oxyhemoglobin.
Science 122, 920 - 921 (1955)
148. Mortensen, H.B.:
Quantitative determination of hemoglobin Alc
by thinlayer isoelectric focusing.
J. Chromatogr. 182, 325 - 333 (1980)
149. Mosca, A.:
Temperatur control in assay of glycosylated
hemoglobins.
Clin. Chem. 26, 1106 - 1107 (1980)
150. Moses, R.G.:
Cystic fibrosis and fast moving hemoglobin.
Med. J. Austr. II, 160 - 161 (1978)

151. Mourits-Andersen, T.; Ditzel, J.:
Hämoglobin-A1c-Konzentration bei neu entdecktem
Diabetes mellitus.
Dtsch. Med. Wschr. 106, 266 - 268 (1981)
152. Niederau, C.M.; Potthoff, S.; Greis, F.A.;
Reinauer, H.:
Zum Aussagewert von glykosylierten Hämoglo-
binen beim Diabetes mellitus und bei Gravidität.
Lab. med. 4, 9 - 14 (1980)
153. Niemand, H.G.:
Praktikum der Hundeklinik.
4. Auflage, Parey Verlag, Berlin Hamburg (1980)
154. Oimoni, M.:
Glycosylated hemoglobin in renal failure.
Diabetologia 21, 163 (1981)
155. Panzer, S.; Kronik, G.; Lechner, K.; Bettelheim, P.;
Neumann, E.; Dudczak, R.:
Glycosylated hemoglobins (GHb): An index of
red cell survival.
Blood 59, 1348 - 1350 (1982)
156. Paulsen, E.P.:
Hemoglobin A1c in childhood diabetes.
Metabolism 22, 269 - 271 (1973)
157. Paulsen, E.P.; Koury, M.:
Hemoglobin A1c levels in insulin-dependent
and -independent Diabetes mellitus.
Diabetes 25, 890 - 896 (1976)

158. Pecoraro, R.E.; Graf, R.J.; Halter, J.B.; Beiter, H.;
Porte, D.:
Comparison of a colorimetric assay for glycosylated
hemoglobin with ion-Exchange chromatography.
Diabetes 28, 1120 - 1125 (1979)
159. Périer, C.:
L'hémoglobine normale adulte glycosylée (Hb A1c).
Lyon Pharmaceutique 30, 453 - 456 (1979)
160. Peterson, C.M.:
Use of minor hemoglobin ratio for the deter-
mination of gestational age.
Am. J. Obstet. Gynecol. 135, 85 - 88 (1979)
161. Pollak, A.; Frsich, H.; Schober, E.:
Hämoglobin A1c (Hb A1c) und juveniler Diabetes
mellitus.
Wien. klin. Wochenschr. 91, 43 - 45 (1979)
162. Prins, H.K.; Huisman, T.H.S.:
Chromatographic estimation of different kinds
of human hemoglobin.
Nature 175, 903 (1955)
163. Rahbar, S.:
An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics.
Clin. Chim. Acta 22, 297 - 298 (1968)
164. Rahbar, S.; Blumenfeld, O.; Ranney, H.M.:
Studies of an unusual hemoglobin in patients
with Diabetes mellitus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 838 - 843 (1969)

165. Rand, P.G.:
Improvements in Hb A1 determination by rapid
cation exchange chromatography.
Clin. Chem. 26, 1209 - 1212 (1980)
166. Rochman, H.:
Hemoglobin A1c and Diabetes mellitus.
Ann. Clin. Lab. Sci. 10, 111 - 115 (1980)
167. Rebore, A.H.; Lewis, H.:
Blood cells in disease.
in: Canine Medicine
Am. Vet. Publication Inc., Drawer KK, St. Barbara,
Calif. (1979)
168. Ryall, R.G.; Graham, J.J.:
Routine measurement of glycosylated hemoglobin.
Lancet II, 739 - 740 (1978)
169. Sabra, G.S.; Mitchell, R.:
Hemoglobin A1 and Diabetes.
Br. Med. J. I, 282, 149 (1981)
170. Sachse, G.; Koch, U.; Laube, H.:
Einfluß von kurzfristigen Blutzuckerschwankungen
auf die Hb A1-Konzentration bei subklinischem
Diabetes mellitus und alloxandiabetischen Ratten.
Akt. Endokrinol. 1, 985 - 987 (1982)
171. Sassi, R.; Wajman, H.; Eschwege, E.; Levy, R.;
Duchateau, A.:
Glycosylated hemoglobin in patients on venesection
therapy for hematochromatosis.
Lancet II, 141 - 142 (1980)

172. Sage, R.A.:
Glycohemoglobin determination.
J. Am. Pediatrics Assoc. 69, 236 - 240 (1979)
173. Saunders, J.; Baron, M.D.; Shenouda, F.S.;
Sönksen, P.H.:
Measuring glycosylated hemoglobin concentrations
in a diabetic clinic.
Diabetologia 19, 563 (1980)
174. Schauder, P.; Hintz, W.:
Bestimmung glykosylierter Hämoglobine mit dem
"Fast Hemoglobin Test System".
Dtsch. Med. Wschr. 106, 262 - 266 (1981)
175. Schernthaner, G.; Stummvoll, K.H.; Müller, M.M.:
Glycosylated hemoglobin in chronic renal failure.
Lancet I, 774 (1979)
176. Schernthaner, G.; Müller, M.M.; Prager, R.:
Die klinische Bedeutung des Glykohämoglobins
(Hb A1).
Wien, klin. Wschr. 92, Suppl. 115, 3 - 11 (1980)
177. Schlotthauer, C.F.; Millar, J.A.S.:
Diabetes mellitus in dogs and cats.
J. Am. Vet. Med. Ass. 118, 31 - 35 (1951)
178. Schmidt, F.H.:
Bestimmung glykosylierter Hämoglobine bei
gesunden und diabetischen Ratten.
persönliche Mitteilung (1982)

179. Schnek, A.G.:
Teh relation between teh minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. J. Am. Chem. Soc. 83, 1472 - 1478 (1960)
180. Schröter, W.:
Glycosylated hemoglobins and their relation to the control of juvenile Diabetes mellitus. Helv. Paediatr. Acta 33, 535 - 542 (1978)
181. Schwartz, H.C.; King, K.C.; Schwartz, A.L.; Edmunds, D.; Schwartz, R.:
Effects of pregnancy on hemoglobin A1c in normal gestational diabetic, and diabetic women. Diabetes 25, 1118 - 1122 (1976)
182. Schartz, H.C.:
Glycosylation and acetylation of hemoglobin in infants of normal and diabetic mothers. Biol. Neonate 28, 71 - 75 (1980)
183. Seal, U.S.:
Carnivora systematics: A study of hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol. 31, 799 - 811 (1969)
184. Shapiro, R.; McMannus, M.J.; Zalut, C.; Bunn, H.F.:
Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. J. Bio. Chem. 255, 3120 - 3127 (1980)
185. Simon, M.; Eissler, J.:
Critical factors in the chromatographic measurement of glycohemoglobin (Hb A1). Diabetes 27, 467 - 474 (1980)

186. Sluiter, W.J.; van Essen, L.H.; Reitsma, W.D.;
Doorenbos, H.:
Glycosylated hemoglobin and iron deficiency.
Lancet I, 531 - 532 (1980)
187. Smith, J.; Wood, P.A.; Moore, K.:
Evaluation of a colorimetric method for
canine glycosylated hemoglobin.
Am. J. Vet. Res. 43, 700 - 701 (1982)
188. Spicer, K.M.; Allen, R.C.; Hallett, D.; Buse, M.G.:
Synthesis of hemoglobin Alc and related minor
hemoglobins by erythrocytes.
J. Clin. Invest. 64, 40 - 48 (1979)
189. Spicer, K.M.; Allen, R.C.; Buse, M.G.:
A simplified assay of hemoglobin Alc in diabetic
patients by use of isoelectric focusing and
quantitative microdensitometry.
Diabetes 27, 384 - 388 (1978)
190. Stenzel, P.; Brimhall, B.:
Preliminary survey of carnivore hemoglobin
compositions.
J. Mol. Evol. 9, 273 - 278 (1977)
191. Stevens, V.J.; Ronzer, C.A.; Monnier, V.M.;
Cerami, A.:
Glycosylation of lens crystallins in diabetic
cataractogenesis.
Diabetes 27, 434 (1978)

192. Stummvoll, H.K.; Müller, M.M.; Schernthaner, G.;
Wolf, A.; Pinggera, W.F.:
Glucosetoleranz und Hämoglobin A₁ bei
Chronischer Niereninsuffizienz.
Wien. Med. Wschr. 130 Suppl. 64, 16 - 18 (1980)
193. Subramaniam, C.V.:
Photometric determination of glycosylation of
hemoglobin in Diabetes mellitus.
Clin. Chem. 26, 1683 - 1687 (1980)
194. Sudhakar Nayak, S.:
A new colorimetric method for the estimation
of glycosylated hemoglobin.
Clin. Chim. Acta 109, 267 - 274 (1981)
195. Svendsen, P.A.; Christiansen, J.S.; Andersen, A.R.;
Welinder, B.; Nerup, J.:
Fast glycosylation of hemoglobin.
Lancet I, 1142 - 1144 (1979)
196. Svendsen, P.A.; Christiansen, J.S.; Seggaard, U.;
Welinder, B.S.; Nerup, J.:
Rapid changes in chromatographically determined
hemoglobin A_{1c} induced by short-term changes in
glucose concentration.
Diabetologia 19, 130 - 136 (1980)
197. Taketa, F.; Smits, M.R.; DiBona, F.J.; Lessard, J.L.:
Studies on cats hemoglobin and hybrids with
human hemoglobin A.
Biochemistry 6, 3809 - 3816 (1967)

198. Taketa, F.; Smits, M.R.; Lessard, J.L.:
Hemoglobin heterogeneity in the cat.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 219 - 226
(1968)
199. Taketa, F.; Attermeier, M.H.; Mank, A.G.:
Acetylated hemoglobins in Feline blood.
J. Biol. Chem. 247, 33 - 35 (1971)
200. Taketa, F.; Mank, A.G.; Lessard, J.L.:
 β -chain amino termini of the cat hemoglobins
and the response to 2,3-diphosphoglycerate and
adenosine triphosphate.
J. Biol. Chem. 246, 4471 - 4476 (1971)
201. Taketa, F.:
Organic phosphates and hemoglobin structure-
function relationship in the feline.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 241, 524 - 537 (1974)
202. Tattersall, R.B.; Pyke, D.A.; Ranney, H.M.;
Bruckheimer, S.M.:
Hemoglobin components in Diabetes mellitus:
Studies in identical twins.
N. Eng. J. Med. 293, 1171 (1975)
203. Tchobroutsky, G.; Charitanski, D.; Blouquit, Y.;
Papoz, L.; Soria, J.; Rosa, J.:
Diabetic control in 102 insulin-treated
out-patients.
Diabetologia 18, 447 - 452 (1980)

204. Torelli, J.A.; Eklund, P.:
Enhanced high-performance liquid chromatographic resolution of hemoglobin A1c at low temperatures.
J. Chromatogra. 233, 334 - 337 (1982)
205. Trivelli, L.A.; Ranney, H.M.; Lai, H.T.:
Hemoglobin components in patients with Diabetes mellitus.
N. Engl. J. Med. 284, 353 - 357 (1971)
206. Trovati, M.:
Glycosylated hemoglobin in patients with newly discovered juvenile-onset Diabetes mellitus in the day immediately following the beginning of insulin treatment.
Acta diabet. lat. 18, 37 - 44 (1981)
207. Tze, W.J.:
Hb A1c - an indicator of diabetic control.
J. Pediatrics 3, 13 - 16 (1978)
208. Vialettes, B.; Vovant, L.; Simon, M.; Lassmann, V.;
Altomare, E.; Vague, P.:
Kinetics of fast hemoglobin in diabetic rats.
Diabetologia 22, 264 - 268 (1982)
209. Wajcman, H.; Dastugue, B.; Labie, D.:
Quantitation of hemoglobin A1c : A rapid automated precision chromatography technique.
Clin. Chim. Acta 92, 33 - 39 (1979)
210. Walinder, O.:
Relation between Hb A1 and determination of glucose in diabetics treated with and without insulin.
Diab. Metab. 6, 251 - 255 (1980)

211. Weiss, C.:
in: Schmidt, R.F.; Thews, G.:
Physiologie des Menschen.
19. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York (1977)
212. Welch, S.G.:
Measurement of glycosylated hemoglobins.
Lancet II, 8383 (1978)
213. Welch, S.G.; Boucher, B.J.:
A rapid microscale method for the measurement
of hemoglobin Ala+b+c.
Diabetologia 14, 209 - 211 (1978)
214. Welinder, B.S.; Svendsen, P.A.:
Heterogeneity of the hemoglobin-A1c-band
in isoelectric focusing.
Diabetologia 19, 465 - 467 (1980)
215. Widness, J.A.; Schwartz, R.; Thompson, D.;
Tsuboi, K.K.; Reynolds, W.A.; Chez, R.A.; Schwartz, H.C.:
Hemoglobin A1c in the glucose-intolerant, strepto-
zotocin-treated or pancreatectomized Macaque Monkey.
Diabetes 27, 1182 - 1188 (1978)
216. Wieland, O.:
Zur Pathobiochemie des diabetischen Spät-
syndroms.
Med. Klin. 69, 1417 - 1423 (1974)
217. Winterhalter, K.H.:
Glykosylierte Hämoglobine und ihre Bedeutung
beim Diabetes mellitus.
Schweiz. Med. Wschr. 109, 1105 - 1106 (1979)

218. Wood, P.A.; Smith, J.E.:
Glycosylated hemoglobin and canine Diabetes mellitus.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 1267 - 1268 (1980)
219. Wood, P.A.; Smith, J.E.:
Elevation rate of glycosylated hemoglobins
in dogs after induction of experimental
Diabetes mellitus.
Metabolism 31, 906 - 909 (1982)
220. Yatscoff, R.W.; Braidwood, J.L.:
Comparison of column chromatographic, colorimetric
and electrophoretic methods of determination of
glycosylated hemoglobin (Hb A1).
Clin. Biochem. 15, 302 - 307 (1982)
221. Yue, D.K.:
Glycosylation of plasma protein and its
relation to glycosylated hemoglobin in
Diabetes.
Diabetes 29, 296 - 300 (1980)

12. Abkürzungstabelle

BZ	- Blutzucker
2,3-DPG	- 2,3- Diphosphoglyzerat
Hb	- Hämoglobin
HMF	- Hydroxymethylfurfural
oGTT	- oraler Glukose-Toleranz-Test
pK-Wert	- Dissoziationskonstante schwacher Säuren
p	- Wahrscheinlichkeit
r	- Korrelationskoeffizient
SD	- Standardabweichung
SE	- Standardfehler
TBA	- Thiobarbitursäure
TCA	- Trichloressigsäure
$\bar{x}$	- arithmetisches Mittel

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Kraft, Vorstand der 1. Medizinischen Tierklinik, daß er die Verantwortung für diese Dissertation übernommen hat. Er trug durch seine bereitwillige und freundliche Unterstützung zum Gelingen des Themas bei.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. K. P. Vick für die Überlassung des Patientenmaterials. Er gewährte jederzeit verständnisvolle Unterstützung.

Herr Prof. Dr. F.H. Schmidt, Leiter der Abteilung Stoffwechsel der Medizinischen Forschung Boehringer Mannheim GmbH, stellte die Labormittel in entgegenkommender Weise zur Verfügung und unterstützte mich mit Ratschlägen. Ihm gilt mein Dank.

Herr Dr. H. Goldhammer, Leiter des Labors des Peter-Friedrich-Ludwig -Hospitals in Oldenburg stellte den Arbeitsplatz zur Verfügung. Ich danke ihm für seine entgegenkommende und freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. H.P. Bäumer und Frau A. Gessner vom Institut für angewandte Statistik der Universität Oldenburg danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Schließlich möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Erhardt für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anleitungen und seine uneigennützige, freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit vielmals danken.

Frau Heide Vick, allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der tierärztlichen Klinik Dr. K.P. Vick, die mich bei dieser Arbeit geduldig und freundlich unterstützten, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Name: Ottemarie Käthe M ü l l e r

Geburtsdatum: 27. Januar 1958

Geburtsort: Fischerhude

Eltern: Heinrich Müller, Landwirt
Ilse Müller, geb. Michaelis

Schul Ausbildung: 1964 - 1967 Volksschule in Fischerhude
1967 - 1969 Realschule in Achim
1969 - 1976 Hermann-Böse-Gymnasium in
Bremen
Mai 1976 Abitur

Berufsausbildung: 1976 - 1981 Studium der Veterinärmedizin
an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover
Dezember 1981 Abschluß der Tierärztlichen
Prüfung
Januar 1982 Approbation
seit März 1982 in der Kleintierklinik
Dr. K.P. Vick in Oldenburg
als prakt. Tierärztin tätig

